R.H.A.C.

MIKROCHIMICA ACTA

HERAUSGEGEBEN VON / EDITORIAL BOARD / PUBLIÉ PAR
A. A. BENEDETTI-PICHLER - New York · G. BLIX - Uppsala
C. DUVAL - Paris · F. FEIGL - Rio de Janeiro · J. HEYROVSKÝ - Praha
P. L. KIRK - Berkeley · H. LIEB - Graz · F. A. PANETH - Mainz
F. SCHNEIDER - New York · R. STREBINGER - Wien
C. L. WILSON - Belfast · M. K. ZACHERL - Wien

MITHERAUSGEBER / ASSISTANT EDITORS / RÉDACTEURS ADJOINTS
E. ABRAHAMCZIK - Ludwigshafen/Rhein · H. K. ALBER - Philadelphia
R. BELCHER - Birmingham · N. D. CHERONIS - New York
F. HECHT - Wien · W. KIRSTEN - Uppsala · A. LACOURT - Bruxelles
W. C. McCRONE - Chicago · A. L. THOMPSON - Montreal
PH. W. WEST - Baton Rouge · M. L. WILLARD - State College

SCHRIFTLEITUNG / EDITORIAL OFFICE / RÉDACTEUR EN CHEF
M. K. ZACHERL - Wien

1957
ZWEITES HEFT
MIT 21 TEXTABBILDUNGEN
ABGESCHLOSSEN AM 22. FEBRUAR 1957

WIEN
SPRINGER-VERLAG
1957

Mikrochim. Acta

Die Zeitschrift

„Mikrochimica Acta"

erscheint ab 1957 zu einem festen Jahresbezugspreis. Im Jahre 1957 wird ein Band von etwa 800 Seiten Umfang zum Jahresbezugspreis von S 660.—, DM 110.—, sfr. 113.—, £ 26.—, $ 9/7/- erscheinen. Der Band setzt sich aus 6 Heften zusammen, die in Abständen von etwa 2 Monaten herausgegeben werden.

Zur Veröffentlichung gelangen Originalarbeiten aus dem Gebiet der allgemeinen und angewandten Mikrochemie in deutscher, englischer und französischer Sprache, wenn sie nicht mehr als 1½ Druckbogen umfassen. Die Reihenfolge der Veröffentlichung richtet sich im allgemeinen nach dem Datum des Eingangs der Manuskripte bei der Redaktion.

Für die Zeitschrift bestimmte Manuskripte aus USA. und Canada sind zu senden an:

Editors of „Mikrochimica Acta", Department of Chemistry, Queens College, Flushing, N. Y., USA. (Dr. A. A. Benedetti-Pichler and Dr. F. Schneider)

Sonstige Manuskripte in englischer Sprache sind zu senden an:

Dr. C. L. Wilson, Department of Chemistry, The Queen's University, Belfast

Manuskripte in französischer Sprache sind zu senden an:

Prof. Clément Duval, Laboratoire de Recherches micro-analytiques de l'E. N. S. C. P., 11, rue Pierre Curie, Paris, 5

Manuskripte in deutscher Sprache sind zu senden an:

Prof. Dr. M. K. Zacherl, Wien, I., Mölkerbastei 5

Geschäftliche Mitteilungen sind zu richten an:

Springer-Verlag, Wien, I., Mölkerbastei 5
Fernsprecher: U 26 5 60 Serie, Telegrammadresse: Springerbuch Wien

Grundsätzlich werden nur Arbeiten angenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite

1957 Inhaltsverzeichnis 2. Heft

Seite

Shell, J. W., N. F. Witt, and **C. F. Poe.** Optical Crystallographic Properties of Some Sulfonamides and Their Diliturates 145

Pungor, E., und **E. É. Zapp.** Flammenphotometrische Bestimmung geringer Mengen Barium in bariumsulfathaltigem Material 150

Zechner, S. Tüpfelreaktion auf Phosphor 159

Pietsch, R. Metallfällungen mit Mono- und Diphenylarsinsäure 161

Bratina, A., M. Perpar und **M. Tišler.** Beitrag zur Bestimmung von Morphin in Mohnkapseln 167

Derkosch, J., und **H. Neuninger.** Spektralanalytische Untersuchungen zur urgeschichtlichen Problematik 174

Fukushima, S., K. Takahashi, S. Terasaka, and **K. Otozai.** New Applications of Addition-Standard Technique in Flame Spectrophotometry 183

Neu, R. Der Nachweis von Flavonen und ihrer Abbauprodukte mit stabilen Diazoniumsalzen durch Tüpfelreaktionen 196

Ziegler, M., O. Glemser und **N. Petri.** Die photometrische Mikrobestimmung des Eisens mit Ferron und Tributylammoniumsalz 215

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite

College of Pharmacy, University of Colorado, Boulder, Colorado

Optical Crystallographic Properties of Some Sulfonamides and Their Dilituratesa

By

John W. Shell, N. F. Witt, and **C. F. Poe***

With 8 Figures

(Received November 9, 1955)

Optical crystallographic properties of the dilituratesa of organic compounds have been used in this laboratory for the purpose of identification[1, 2]. The present communication reports the optical crystallographic properties for sulfacetamide, sulfathalidine, Gantrisin, Elkosin, and their dilituratea derivatives. The optical properties of several sulfonamides have been reported by *Castle*, *Witt* and *Poe*[2, 5].

Experimental Part

The dilituric acid derivatives were prepared by reacting equimolar quantities of the sulfonamide and dilituric acid (5-nitrobarbituric acid) in 95% ethanol and refluxing the mixture for a period of four hours. Crystals usually separated on cooling and were filtered and dried. The crystals were dissolved in the proper solvent and recrystallized until a pure compound was obtained.

Each compound was tested for solvent content by the Abderhalden method. Melting point and nitrogen determinations were performed to determine the purity of the compounds. Because of decomposition, melting points are, in many instances, of little value. Molar refractions are reported for all the compounds. Density determinations were made by an adaptation of the free flotation method of *Thomson* as described by *Bernal* and *Crowfoot*[3]. The above-mentioned data are included in Table I.

The optical properties of the crystals were determined by use of a Leitz petrographic microscope, model No. 30 CM, equipped with a five-

* For reprints address the junior author, University of Colorado, Boulder, Colorado, USA.

Table I. Physical Data

Compound	Melting Point	Density	$\sqrt[3]{\alpha\beta\gamma}$	Molar Refraction	
				Calculated	Observed
Elkosin, $C_{12}H_{16}N_4O_2S$	243°	1.383	1.711	78.3	79.4
Elkosin dilituratedihydrate, $C_{16}H_{19}N_7O_7S \cdot 2\,H_2O$	175° decom.	1.629	1.668	112.4	111.8
Gantrisin, $C_{11}H_{13}N_3O_3S$	190°	1.350	1.648	72.4	72.1
Gantrisin dilituratedihydrate, $C_{15}H_{16}N_6O_8S$	194° decom.	1.569	1.665	103	105
Sulfacetamide, $C_8H_{10}N_2O_3S$ ...	182°	1.350	1.614*	54.8	55.4
Sulfacetamide dilituratedihydrate, $C_{12}H_{13}N_5O_8S$	202° decom.	1.569	1.623	86.0	87.1
Sulfathalidine, $C_{17}H_{13}N_3O_5S_2$..	273° decom.	1.522	1.692	101.6	101.3

* $\sqrt{\omega^2\,\epsilon}$

axis universal stage. Light from a sodium vapor source, giving monochromatic (5893 Å) light was used. Refractive indices were measured by the immersion method with the media described by *Winchell*[4]. The indices were determined at $25° \pm 1°$ C at principal crystallographic orientations, as indicated by interference figures. They are usually accurate to $\pm$ 0.002.

The optical data are presented in Table II. Since all such values are constant for only a given polymorph of a compound[5], they are valid only for the solvent and conditions of crystallization stated. In the present study, aqueous ethanol mixture was used to recrystallize Gantrisin and the dilituratedihydrate of Elkosin; sulfacetamide and Gantrisin dilituratedihydrate were recrystallized from ethanol and sulfathalidine from methanol. Hot water was used for Elkosin and sulfacetamide dilituratedihydrate.

The typical crystalline habits are recorded in Figs. 1 to 7. A complete description of the optical orientation for a triclinic crystal is of such complexity that it is best described in stereographic projection. This is done for Elkosin dilituratedihydrate, Fig. 8.

Summary

The optical properties of sulfacetamide, sulfathalidine, Gantrisin, and Elkosin have been investigated. A series of dilituric acid salts of three of the above sulfonamides has been prepared and their melting

Table II. Optical Properties

Compound	Crystallizing Solvent	Crystall System and Habit	Optic Sign	Optic Orientation	Optic Axial Angle	Dispersion	Refractive Indices		
							α	β	γ
Elkosin	water	Orthorhombic, prismatic	—	$a = Z$ $b = Y$	32°	strong, axial: $v > r$	1.588	1.753	1.800*
Elkosin diliturate dihydrate	aqueous ethanol	Triclinic, acicular	—	**	33°	strong, assymmetrical: $v > r$	1.477	1.760	1.785*
Gantrisin	aqueous ethanol	Orthorhombic, columnar	+	$a = Z$ $b = X$	80°	extreme, axial: $r > v$	1.602	1.642	1.701
Gantrisin diliturate	ethanol	Monoclinic, equant	+ $\wedge$	$b = X$ $c \wedge Y = (-)\ 35°$	43°	strong, horizontal: $r > v$	1.620*	1.635	1.741
Sulfacetamide	ethanol	Tetragonal, dipyramidal	+	—	0°	none	1.565 (ω)		1.718 (ϵ)
Sulfacetamide diliturate	water	Monoclinic, tabular	— $\wedge$	$b = Y$ $c \wedge X = 45°$	58°	strong, axial: $v > r$	1.489	1.642	1.750*
Sulfathalidine	methanol	Monoclinic, tabular	+ $\wedge$	$b = Z$ $c \wedge X = (-)\ 43°$	$56^1/_2$°*	strong, crossed: $v > r$	1.642	1.670	1.767

* Calculated.

** In stereographic projection, see Fig. 8

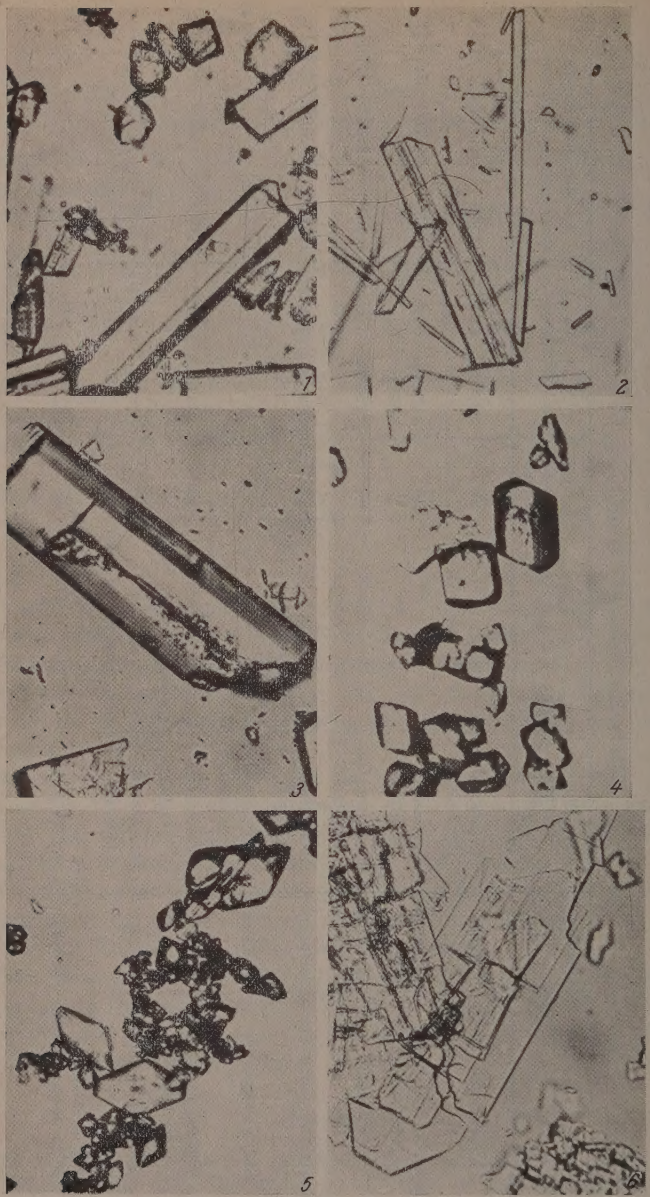


Fig. 1—6.

Fig. 1. Elkosin 350 ×. Fig. 2. Elkosin Diliturate 350 ×. Fig. 3. Gantrisin 350 ×. Fig. 4. Gantrisin Diliturate 170 ×. Fig. 5. Sulfacetamide 350 ×. Fig. 6. Sulfacetamide Diliturate 350 ×.

points, analyses, and optical properties have been determined. The densities and molar refractions of the four sulfonamides and of three of their dilituratе salts have been reported.

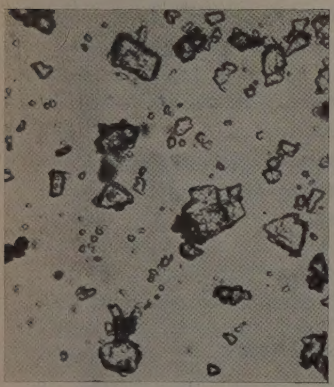


Fig. 7. Sulfathalidine 350 ×.

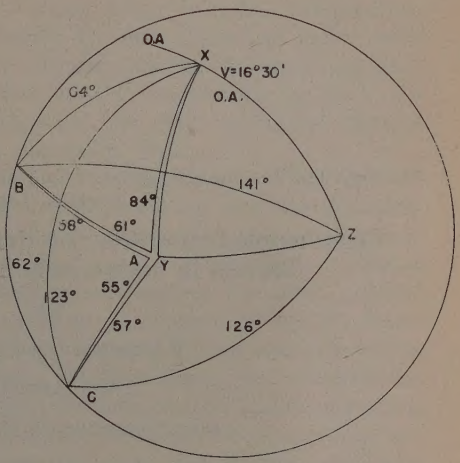


Fig. 8. Stereographic Projection of the Optical Orientation in Crystals of Elkosin Diliturate.

Zusammenfassung

Die optischen Eigenschaften von Sulfathalidin (saures Phthalylsulfathiazol), Sulfacetamid, Gantrisin (3,4-Dimethyl-5-sulfanilamidoisoxazol) und Elkosin (6-Sulfanilamido-2,4-dimethylpyrimidin) wurden untersucht. Von den drei letztgenannten Sulfonamiden wurden die Diliturate (5-Nitrobarbiturate) hergestellt und zur Bestimmung des Schmelzpunktes und der optischen Eigenschaften verwendet. Die Dichten und Molekularrefraktionen der vier genannten Sulfonamide und der drei Diliturate werden mitgeteilt.

Résumé

Recherches sur les propriétés optiques de la «Sulfathalidine» (Phtalylsulfathiazol acide), de la sulfacetamide, de la «Gantrisine» (3,4-diméthyl-5-sulfanilamidoisoxazol) et de «l'Elkosine» (6-sulfanilamido-2,4-diméthylpyrimidine). Préparation des diliturates (5-nitrobarbiturate) des trois dernières sulfamides pour la détermination de leurs points de fusion et de leurs propriétés optiques. Publication des densités et des réfractions moléculaires des quatre sulfamides et des trois diliturates.

Literature

[1] *R. Castle, N. F. Witt* and *C. F. Poe*, J. Amer. Chem. Soc. **71**, 228 (1949).

[2] *J. Larsen, C. F. Poe* and *N. F. Witt*, Mikrochem. **34**, 351 (1949).

[3] *J. D. Bernal* and *D. Crowfoot*, Nature **134**, 809 (1934).

[4] *A. N. Winchell*, The Microscopic Characters of Artificial Inorganic Solid Substances or Artificial Minerals. New York: Wiley. 1931. p. 24.

[5] *B. J. White, N. F. Witt, J. A. Biles*, and *C. F. Poe*, Analyt. Chemistry **22**, 950 (1950).

Aus dem Institut für anorganische und analytische Chemie der L. Eötvös-Universität, Budapest

Flammenphotometrische Bestimmung geringer Mengen Barium in bariumsulfathaltigem Material

Von

E. Pungor und E. É. Zapp

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 18. September 1956)

In einzelnen Fällen ist bei der Untersuchung von Gesteinen die quantitative Analyse des Barytgehalts notwendig. Im Rahmen einer konkreten Aufgabe befaßten auch wir uns mit der Bestimmung des Barytgehalts eines silikathaltigen Minerals. In diesem Falle war die vorhandene Barytmenge gering, so daß zu befürchten war, mit einer gewichtanalytischen Bestimmung keine zufriedenstellenden Ergebnisse erhalten zu können. Da Barium flammenphotometrisch leicht meßbar ist, lag es nahe, die Bestimmung mit Hilfe eines Flammenphotometers zu versuchen. Nach entsprechendem Aufschluß ist es am zweckmäßigsten, Barium mit Hilfe seines Molekülspektrums unter Verwendung des 870-mμ-Bereichs zu bestimmen[1].

Die zur flammenphotometrischen Untersuchung vorbereitete Lösung soll nach Möglichkeit an Anionen nur Chlorid enthalten. Hinsichtlich der Kationen ist es erforderlich, die Konzentration der neben Barium vorhandenen Erdalkalimetalle ungefähr 10^{-3} Mol/l und die Konzentration der Alkalimetalle 0,1 Mol/l nicht überschreiten zu lassen. Die Metalle (z. B. Aluminium), die ihren amphoteren Eigenschaften nach in der Flamme mit Barium schwer dissoziierbares Salz bilden und insofern eine den Anionen analoge Wirkung ausüben, vermindern die Emission Es ist natürlich vorteilhaft, wenn diese Metalle gar nicht vorhanden sind; sind sie jedoch im aufgeschlossenen Material anwesend, so kann ihre Störwirkung auf die später angegebene Art behoben werden.

Die analytische Aufgabe besteht also im Falle eines Baryt enthaltenden Silikats darin, daß die zur flammenphotometrischen Messung verwendete

Lösung nach dem Aufschluß des Bariumsulfats nur Chloridionen enthalten und die Konzentration der gegebenen Kationen die vorerwähnten Werte nicht überschreiten darf. Diese Aufgabe kann durch den Aufschluß des Bariumsulfats mit Natriumcarbonat als Aufschlußmittel nicht gelöst werden. Sonst wird nämlich der Lösung recht viel Natrium zugeführt, wodurch sich die Bariumbestimmung sehr umständlich gestaltet (Anwendung eines Berechnungsverfahrens), im Falle geringerer Bariumkonzentrationen sogar gänzlich unmöglich wird.

Daher haben wir zum Aufschluß von Bariumsulfat eine neue Methode ausgearbeitet. Diese beruht auf der Beobachtung, daß das Flammenphotometer bei der Behandlung barythaltiger Silikate mittels Fluorwasserstoff in Gegenwart von Oxalsäure und Jodwasserstoff — Barium anzeigt. Zu unseren Untersuchungen verwendeten wir frisch gefälltes Bariumsulfat, das mit Fluorwasserstoff in Gegenwart von Oxalsäure und Jodwasserstoff behandelt wurde, wobei flammenphotometrisch kein Barium beobachtet werden konnte. Dagegen gelang der Aufschluß bei Zugabe von Siliciumdioxyd zu einem Gemisch gleicher Zusammensetzung. Wurde von den erwähnten Reagenzien Jodwasserstoff nicht zugegeben, so war Barium flammenphotometrisch nicht nachweisbar. Oxalsäure kann dem zu untersuchenden Stoff auch nach dem Aufschluß beigefügt werden; auch in diesem Falle tritt die Emission des Bariums auf (das Ergebnis ist jedoch ungenau).

Auf Grund unserer Beobachtungen haben wir festgestellt, daß sich zwischen Bariumsulfat und Kieselfluorwasserstoffsäure — entstanden aus Fluorwasserstoff und Siliciumdioxyd — ein Gleichgewicht einstellt. Die entstandene Schwefelsäure wird durch Jodwasserstoff zu schwefliger Säure reduziert, letztere zersetzt sich in saurem Medium, so daß sich das zwischen Bariumsulfat und Kieselfluorwasserstoffsäure bestehende Gleichgewicht verschiebt, bis letzten Endes alles Bariumsulfat quantitativ in Bariumsilikofluorid umgesetzt ist, das in Wasser schwer löslich ist. Es muß in eine salzsäurelösliche Verbindung übergeführt werden, welche die bereits erwähnten störenden Anionen nicht enthält. Wir haben zu diesem Zweck Oxalsäure benutzt, in deren Gegenwart aus Bariumsilikofluorid Bariumoxalat — und bei hinreichend hoher Temperatur — Bariumcarbonat entsteht.

Der Aufschlußvorgang kann durch folgende Reaktionsgleichungen zusammengefaßt werden:

$$SiO_2 + 6\,HF = H_2SiF_6 + 2\,H_2O, \tag{1}$$

$$BaSO_4 + H_2SiF_6 \rightleftharpoons BaSiF_6 + H_2SO_4, \tag{2}$$

$$H_2SO_4 + 2\,HJ = 2\,H_2O + SO_2 + J_2, \tag{3}$$

$$BaSiF_6 + H_2C_2O_4 = BaC_2O_4 + H_2SiF_6, \tag{4}$$

$$BaC_2O_4 = BaCO_3 + CO. \tag{5}$$

Reaktionsstufen während des Aufschlußprozesses

Bevor wir unsere Erfahrungen auf dem Gebiete des quantitativen Aufschlusses von Bariumsulfat besprechen, möchten wir uns mit den Versuchen befassen, die Reaktionen (1) bis (5) zu beweisen. Diese wurden in zwei Reihen durchgeführt. In der ersten Gruppe der Versuche haben wir das aus Pro-analysi-Reagenzien frisch bereitete Bariumsulfat in Gegenwart von Jodwasserstoff und Fluorwasserstoff in einem Platingefäß auf dem Wasserbad eingedampft, anschließend auf einem Sandbad ungefähr eine halbe Stunde lang auf 200° C gehalten und das Gewicht des im Exsikkator ausgekühlten Platintiegels samt Inhalt gemessen. Unserer Annahme nach mußte sich hierbei das Bariumsulfat in Bariumsilikofluorid verwandeln. Nach dem Abwägen haben wir den Tiegel bei Rotglut erhitzt, wobei nach den Literaturangaben[2] aus dem Bariumsilikofluorid Siliciumtetrafluorid entweicht und Bariumfluorid zurückbleibt. Wir haben das erhaltene Produkt nach dem Abkühlen im Exsikkator erneut gewogen. Zuletzt wurde mit Schwefelsäure abgeraucht, wonach sich wieder das ursprüngliche Gewicht des Bariumsulfats ergeben mußte.

In der zweiten Gruppe der Versuche haben wir den Aufschluß des Bariumsulfats in Gegenwart von Oxalsäure mit Siliciumdioxyd, Fluorwasserstoff und Jodwasserstoff ebenfalls im Platingefäß durchgeführt. Anschließend haben wir bei Rotgluttemperatur geglüht, wobei sich

Tabelle 1

$BaSO_4$ Einwaage mg	Art der Untersuchung	$BaSiF_6$		BaF_2		$BaCO_3$		$BaSO_4$	
		berechnet mg	gefunden mg	berechnet mg	gefunden mg	berechnet mg	gefunden mg	berechnet mg	gefunden mg
20,3	I.	24,3	24,7	15,3	17,2	17,2	17,9		
21,5	II.	25,7	28,8	16,2	18,7	18,2	19,4		
31,4	II.	37,6	38,0	23,6	24,4	26,6	25,0		
27,1	I.	32,5	33,0	20,4	22,4			27,1	27,3
25,7	II.	30,9	30,9	19,3	20,4			25,7	24,6
24,4	II.	29,2	30,1	18,2	19,6			24,4	23,6
22,1*	I.	26,5	28,3	16,6	19,6				
20,3*	II.	24,4	25,9	15,2	17,3				
22,5	III.					19,0	19,1		
22,5	III.					19,0	19,0		

I.: Aufschluß in Gegenwart von Kieselfluorwasserstoffsäure und Jodwasserstoff, sodann mit Oxalsäure bzw. Schwefelsäure umgesetzt.
II.: Aufschluß in Gegenwart von Siliciumdioxyd, Fluorwasserstoff und Jodwasserstoff, sodann mit Oxalsäure bzw. Schwefelsäure umgesetzt.
III.: Aufschluß in Gegenwart von Oxalsäure, Siliciumdioxyd, Fluorwasserstoff und Jodwasserstoff.
* Die Muster wurden auf Jodidion untersucht.

Bariumcarbonat bilden mußte. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Hier sind die auf Grund der Messung berechneten und gemessenen Bariumsilikofluorid-, Bariumfluorid- und Bariumcarbonat-, sowie auch die gewonnenen Bariumsulfatmengen angeführt.

Aus der Tabelle 1 ist zu ersehen, daß zwischen den berechneten und den gemessenen Werten für Bariumsilikofluorid und Bariumfluorid kleinere oder größere Abweichungen bestehen. Um die Ursache festzustellen, haben wir untersucht, ob das durch den Aufschluß erhaltene Material neben Silikofluorid und Fluorid auch andere Anionen enthält. Wegen des in großen Mengen verwendeten Jodwasserstoffs war zu erwarten, daß in dem entstandenen Produkt neben Bariumsilikofluorid bzw. Bariumfluorid auch Bariumjodid zu finden sein werde. Um dies zu entscheiden, wurde das aufgeschlossene Material mit Hilfe der von *Schulek* modifizierten[3] *Winkler*schen Jodidbestimmung[4] analysiert und festgestellt, daß in den beiden untersuchten Mustern auch Bariumjodid enthalten war. Die Menge der Jodidionen betrug bei den mit * bezeichneten Daten der Tabelle 1 der Reihe nach $1{,}25 \cdot 10^{-5}$ bzw. $1{,}5 \cdot 10^{-5}$ g. Unter der Voraussetzung, daß in den beiden letzten Fällen neben Jodid nur Silikofluorid bzw. Fluorid vorhanden war, kann aus der Bariumsulfatmenge der voraussichtliche Wert des bariumjodidhaltigen Bariumsilikofluorids und Bariumfluorids berechnet werden. Der auf diese Weise erhaltene theoretische Wert entspricht annähernd — s. Tabelle 2 — den Meßergebnissen.

Tabelle 2

$BaSO_4$ Einwaage mg	$BaSiF_6 + BaJ_2$		$BaF_2 + BaJ_2$	
	berechnet mg	gefunden mg	berechnet mg	gefunden mg
22,1	27,2	28,3	18,0	19,6
20,3	25,3	25,9	16,8	17,3

Wird der Aufschluß von Bariumsulfat in Gegenwart von Oxalsäure durchgeführt, sodann das Platingefäß auf Rotgluttemperatur erhitzt, so entspricht der Rückstand demjenigen Wert, den wir bei der Bildung von Bariumcarbonat erwartet hatten.

Aus obigen Ergebnissen folgt, daß die in den Gleichungen (1) bis (5) angegebenen Reaktionsstufen dem Aufschlußvorgang entsprechen. Mit der Kinetik der einzelnen Teilvorgänge werden wir uns in einer weiteren Abhandlung befassen. Wir wollen jedoch schon jetzt bemerken, daß auf Grund unserer bisher erzielten Ergebnisse der langsamste Vorgang des Aufschlusses die Reduktion der freiwerdenden Schwefelsäure ist.

Diese Feststellung wurde mit einem Barytmodell getroffen, wobei dieses zu feinem Staub zerrieben und der Aufschluß in Gegenwart von

etwas weniger Jodwasserstoff durchgeführt wurde. Die aus dem aufgeschlossenen Material in üblicher Weise hergestellte Lösung sowie die aus dem verbrauchten Baryt gewonnene Suspension haben wir unter dem Mikroskop untersucht. Unsere flammenphotometrischen Messungen ergaben, daß der Aufschluß nicht vollkommen war, was sich übrigens auch daran erkennen ließ, daß die Lösung sichtbar Bariumsulfat suspendiert enthielt. Unter dem Mikroskop hatten nämlich die ursprünglichen Barytteilchen eine unebene gebrochene Grenzfläche, während die mikroskopische Untersuchung der nach dem Aufschluß erhaltenen Lösung eine für Bariumsulfat charakteristische Kristallform[5] aufwies. Der Aufschluß des Baryts ging zwar vor sich, aber in der Lösung wurde unter Einwirkung der vorhandenen Schwefelsäure wieder Bariumsulfat ausgeschieden.

Prof. *Schulek* beobachtete, daß es schwierig ist, die Reduktion der Schwefelsäure mit Jodwasserstoff quantitativ durchzuführen*. Die quantitative Reaktion gelingt nur mit geringen Mengen Sulfat. Bei dem Aufschluß ist also darauf zu achten, daß die Bariumsulfatmenge nicht die von der Jodwasserstoffreduktion geforderte Grenze überschreitet. Erfahrungsgemäß beträgt die noch aufschließbare Bariumsulfatmenge ungefähr 0,1 Millimol.

Beschreibung des Verfahrens

Verwendete Reagenzien:

Fluorwasserstoffsäure p. a., etwa 40%ig;
Jodwasserstoffsäure p. a., etwa 70%ig;
Oxalsäure p. a.;
Siliciumdioxyd, durch mehrfaches Aufkochen mit Salzsäure gereinigt;
Salzsäure p. a., etwa 20%ig.

Das 0,01 bis 0,02 g Bariumsulfat enthaltende Material wurde mit analytischer Genauigkeit in einen Platintiegel eingewogen, und dann 0,05 g Siliciumdioxyd, 3 ml Jodwasserstoffsäure, sowie 3 ml Fluorwasserstoffsäure und 0,5 g Oxalsäure beigefügt. Die auf diese Weise erhaltene Mischung wird auf einem Wasserbade — das in einem gut funktionierenden Abzug aufgestellt war — bis zur Trockne eingedampft und anschließend noch einmal 3 ml Jodwasserstoffsäure und zweimal je 3 ml Fluorwasserstoffsäure beigemischt. Der erneut bis zur Trockne eingedampfte Stoff wird dann in einem Sandbad eine halbe Stunde lang auf 200 bis 300° C gehalten und der Inhalt des Platintiegels in ungefähr 20%iger Salzsäure durch Erwärmen gelöst. Der Bariumgehalt der erhaltenen Lösung kann mit Hilfe des *Beckman*schen Flammenphotometers bei der Wellenlänge 870 mμ bestimmt werden.

* Persönliche Mitteilung von Prof. Dr. *E. Schulek*.

Die Eichkurve ist linear, wenn mit einem Apparat ohne Nebelkammer gearbeitet wird. Die für die Messung am besten geeignete Bariumkonzentration liegt zwischen 10^{-4} und 10^{-2} Mol/l.

Die Daten des von uns benutzten *Beckman*schen Flammenphotometers sind folgende:

Spaltbreite: 0,1 bis 0,5 mm je nach der Stärke der Emission,

Wasserstoffdruck: 0,21 atü,

Sauerstoffdruck: 1,61 atü.

Einige unserer mit frisch gefälltem Bariumsulfat durchgeführten Versuche sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Auf Grund dieser Daten beträgt der Fehler des Mittelwertes 0,75% und der mittlere Fehler der einzelnen Messungen 2,25%.

Tabelle 3

$BaSO_4$ Einwaage mg	mg $BaSO_4$ aus der flammenphotometrischen Messung berechnet	Δ %
16,6	16,2	— 2,4
22,5	22,3	— 0,9
20,2	20,1	— 0,5
11,7	11,7	0
19,0	19,3	+ 1,6
11,9	11,8	— 0,9
12,7	12,5	— 1,6
13,4	13,2	— 1,5
14,7	14,0	— 4,7
15,8	16,4	+ 3,8

Fehlermöglichkeiten und ihre Ausschaltung

Bereits in der Einleitung verwiesen wir darauf, daß einzelne Anionen und einige amphotere Elemente eventuell das Ergebnis der flammenphotometrischen Bestimmung des Bariums stören können. Die in der Natur vorkommenden barythaltigen Silikatmuster enthalten oft Aluminiumsalze. Aluminium bildet in der Flamme Bariumaluminat, wodurch sich die Emission des Bariums vermindert. Falls die als Standard benutzte Bariumchloridlösung kein Aluminium enthält, ergibt sich, daß die aus der Bariumemission der aluminiumhaltigen Lösung berechnete Bariumkonzentration weit niedriger als der tatsächliche Wert ist. Den Beweis hierfür liefern die in Abb. 1 angeführten Meßergebnisse, wonach die Bariumemission in Gegenwart von Aluminium bedeutend geändert ist.

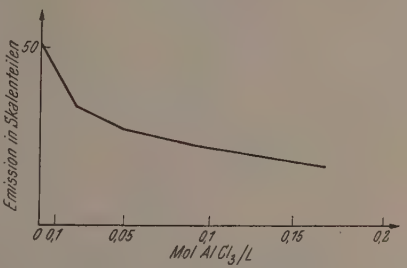


Abb. 1

Enthält der zu untersuchende Stoff eine unbekannte Aluminiummenge, so muß sowohl der zu untersuchenden Lösung als auch der Standardlösung eine solche Aluminiummenge beigemischt werden, daß praktisch keine wesentliche Änderung der Aluminiumkonzentration in

der zur flammenphotometrischen Messung verwendeten Lösung durch den Aluminiumgehalt des Materials verursacht werden kann.

Von den zum Aufschluß benutzten Stoffen kann noch Jodwasserstoff einen Meßfehler hervorrufen, da er, wie wir uns öfters überzeugen konnten (s. Tabelle 4, in der sich die Emission mit der Zunahme der Jodwasserstoffmenge vermindert), eventuell auch eine geringe Menge Phosphorsäure enthalten kann. Die Phosphorsäure setzt die Emission des Bariums in bedeutendem Maße[6] herab. Da bereits eine geringe Phosphorsäuremenge beträchtliche Störwirkung verursacht, ist die Anwendung phosphorsäurehaltiger Jodwasserstoffsäure streng zu vermeiden.

Tabelle 4

$BaCl_2$-Konzentration Mol/L	Zugabe von 70%igem HJ ml	Emission
10^{-3}	0	99,0
	5	72,5
	10	59,0

Bei einigen unserer Aufschlüsse verfügten wir nicht über phosphorsäurefreie Jodwasserstoffsäure, so daß wir den hierdurch entstandenen Fehler ausschalten mußten. Das Problem kann von zwei Seiten gelöst werden. Erstens kann parallel mit dem aufzuschließenden Material Bariumchloridlösung auf gleiche Weise behandelt werden. In diesem Falle stimmt die Menge der mit dem Jodwasserstoff eingeführten Phosphorsäure bei dem als Standard benutzten Bariumchlorid und dem aufgeschlossenen Bariumsulfat überein. Der richtige Wert kann hierbei nur dann erhalten werden, wenn der Bariumgehalt des Chlorids und des aufgeschlossenen Sulfats ungefähr gleich ist. Da diese Bedingung bei einem unbekannten Stoff schwer erfüllt werden kann, halten wir für die Ausschaltung der Störwirkung der Phosphorsäure folgendes Verfahren für weit brauchbarer.

Es wird der Standard- und der zu untersuchenden Lösung in gleichem Maße Aluminiumchlorid in großer Menge beigemischt, wodurch der Phosphorsäureeffekt behoben wird; wenn die Menge der Phosphorsäure im Verhältnis zu der Aluminiumkonzentration unbedeutend klein ist, kann aus den Meßergebnissen die Bariumkonzentration bestimmt werden.

Aufschluß barythaltiger Silikatminerale

Nach dem hier beschriebenen Verfahren haben wir mehrere hundert barythaltige Silikate untersucht. Einige unserer Ergebnisse sind in Tabelle 5 angeführt. Da der zum Aufschluß benutzte Jodwasserstoff in einigen Fällen Phosphorsäure enthielt und in den meisten Mustern auch Aluminium enthalten war, haben wir die flammenphotometrische Messung so durchgeführt, daß wir der zu untersuchenden Lösung Aluminium bis zu einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-2}$ Mol/l beimengten. Die Standard-Bariumchloridlösung enthielt übrigens die gleiche Aluminiummenge.

Tabelle 5

Nummer des Musters	Einwaage mg	% Ba	Mittelwert %	Δ %
1	33,6 32,2	0,5 0,3	0,4	
2	206,1 108,1	3,9 3,7	3,8	$\pm$ 2,6
3	40,2 31,6	11,0 12,0	11,5	$\pm$ 4,5
4	41,4 22,6	14,2 13,9	14,05	$\pm$ 1,1
5	47,5 31,9	15,8 15,4	15,6	$\pm$ 1,3
6	55,8 15,3	19,0 18,2	18,6	$\pm$ 2,1
7	23,2 19,6	23,6 24,5	24,05	$\pm$ 2,3
8	41,0 12,6	24,2 25,0	24,6	$\pm$ 1,6
9	41,0 14,7	25,8 25,5	25,65	$\pm$ 0,6
10	95,6 22,7	26,0 26,0	26,0	0
11	38,8 15,3	28,0 29,0	28,5	$\pm$ 1,8
12	21,0 12,9	31,5 30,6	31,05	$\pm$ 1,4
13	25,3 20,3	35,5 36,9	36,2	$\pm$ 1,9

Die Tabelle zeigt, daß die Streuung der einzelnen Messungen im allgemeinen $\pm$ 3% nicht überschreitet und der mittlere Fehler der einzelnen Messungen 2,1%, der Fehler des Mittelwerts 0,43% beträgt. Eine Ausnahme bilden nur diejenigen Messungen, bei denen der Bariumsulfatgehalt unter 1% liegt, in welchem Falle der relative Fehler größer ist.

Wir sprechen an dieser Stelle Herrn *J. Trompler* und Fräulein *I. Konkoly Thege* unseren besten Dank für ihre mühevolle Arbeit aus,

die uns bei dem Aufschluß von ungefähr 400 Silikatgesteinmustern Hilfe geleistet haben.

Zusammenfassung

Verfasser haben ein Verfahren zum Aufschluß des Bariumsulfats ausgearbeitet. Der Aufschluß wird mit Hilfe von Kieselfluorwasserstoffsäure durchgeführt und die entstehende Schwefelsäure mit Jodwasserstoff reduziert, sodann das Barium nach Beendigung des Aufschlußprozesses in Gegenwart von Oxalsäure in Bariumcarbonat verwandelt. Nach der Lösung des Bariumcarbonats mit Salzsäure wurde das Barium flammenphotometrisch gemessen.

Summary

The authors have worked out a procedure for decomposing barium sulfate. The decomposition is accomplished with the aid of hydrofluosilicic acid and the resulting sulfuric acid is reduced with hydrogen iodide. After the completion of the disintegration process, the barium is converted to barium carbonate in the presence of oxalic acid. The latter is dissolved in hydrochloric acid and the barium then determined by the flame photometer.

Résumé

Les auteurs ont mis au point une technique d'attaque du sulfate de baryum. Cette attaque est effectuée à l'aide d'acide fluosilicique; l'acide sulfurique libéré est réduit par l'acide iodhydrique; après l'attaque le baryum est fixé sous forme de carbonate en présence d'acide oxalique. Le carbonate de baryum est dissout dans l'acide chlorhydrique, et dosé par photométrie de flamme.

Literatur

[1] *E. Pungor* und *A. Hegedüs*, Magyar Kémiai Folyóirat **61**, 308 (1955).

[2] *Berzelius* und *Truchot*, C. r. acad. sci., Paris **98**, 821 (1884).

[3] *E. Schulek*, Analyt. Chim. Acta **2**, 74 (1948).

[4] *L. W. Winkler*, Ausgewählte Untersuchungsverfahren für das chemische Laboratorium. Bd. XXIX: Die chemische Analyse. Herausgegeben von *W. Böttger*. Stuttgart: F. Enke. 1931. S. 69.

[5] *E. Schulek*, *E. Pungor* und *F. Guba*, Analyt. Chim. Acta **10**, 506 (1954).

[6] *E. Pungor* und *A. Hegedüs*, im Druck.

Aus dem Laboratorium der Luossavaara-Kiirunavaara Aktiebolag, Kiruna C, Schweden

Tüpfelreaktion auf Phosphor

Von

S. Zechner

(Eingegangen am 9. Oktober 1956)

Fünfwertiger Phosphor bildet mit verschiedenen Chinolinmolybdatlösungen[1–3] eine gelbe Fällung von Chinolinmolybdophosphat. P-Bestimmungen nach dieser Methode erwiesen sich besonders bei niedrigen Phosphorgehalten und in Gegenwart von Vanadium als geeignet[2,3]. Für den Nachweis von Phosphor in Erzlagerstätten findet eine modifizierte Methode (*Chimo*-Test) Anwendung[4].

Für die Tüpfelreaktion werden mit einer Chinolinmolybdatlösung imprägnierte Rundfilter verwendet.

Die Erfassungsgrenze des Nachweises beträgt 1 μg P^{5+}, die Grenzkonzentration 1 : 50000.

Arbeitsvorschrift

Darstellung des Reagenspapieres: 10 g $Na_2MoO_4 \cdot 12\,H_2O$ werden in 25 ml dest. Wasser gelöst und mit 11 ml konz. Salzsäure und 10 ml konz. Salpetersäure versetzt. 1,4 ml Chinolin werden in einer Mischung von 15 ml dest. Wasser, 7 ml konz. Salzsäure und 6 ml konz. Salpetersäure gelöst. Beide Lösungen werden unter Umrühren zusammengegossen und mit 60 ml dest. Wasser versetzt. Die filtrierte Lösung ist mindestens 4 Wochen haltbar.

Rundfilter* (Durchmesser 7 cm) werden mit der oben beschriebenen Lösung benetzt und im Trockenschrank bei 60 bis 70° C getrocknet. Die auf diese Weise imprägnierten Rundfilter sind sehr haltbar. Nach 5 Monaten, an einer lichtgeschützten Stelle verwahrt, waren sie unverändert anwendbar.

Nachweis des Phosphors: Man bringt in die Mitte eines Reagenspapieres 0,05 ml der zu prüfenden, oxydierten Lösung, die 0,1- bis 1,6-m salz- oder salpetersauer sein soll. Die Anwesenheit von Phosphor wird durch eine hellgelbe Färbung in der Mitte angezeigt.

* Verfasser verwendete „Munktells Swedish Filtering Paper" Nr. OOH.

Das Verhalten von Fremdionen ist aus Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1. Tüpfelreaktionen auf mit Chinolinmolybdatlösung imprägniertem Rundfilter

Ion	Menge	Reaktion	
		an der feuchten Teststelle	nach Trocknen der Teststelle
P^{5+}	1 μg	deutlich erkennbare gelbe Fällung im Zentrum der Tüpfelstelle	deutlich erkennbare gelbe Fällung im Zentrum der Tüpfelstelle
	5 „	starke gelbe Fällung im Zentrum der Tüpfelstelle	starke gelbe Fällung im Zentrum der Tüpfelstelle
V^{5+}	5 „	keine	keine
	10 „	„	„
	50 „	„	Tüpfelstelle rotbraun gefärbt
As^{3+}	7 „	„	keine
	14 „	„	„
	70 „	„	„
	0,2 mg	„	blaugrüner Hof
Fe^{3+}	33 μg	„	gelbbrauner Hof
	0,1 mg	Tüpfelstelle schwach gelbbraun gefärbt	Tüpfelstelle gelbbraun gefärbt

Der Verfasser dankt Herrn Oberingenieur *Uno Fernlund* für sein förderndes Interesse an dieser Arbeit.

Zusammenfassung

Eine Tüpfelreaktion auf Phosphor wird beschrieben, die auf der Bildung von Chinolinmolybdophosphat auf einem mit einer Chinolinmolybdatlösung imprägnierten Rundfilter beruht. Die Erfassungsgrenze beträgt 1 μg P^{5-}. Das Reagenspapier ist einfach darzustellen und gut haltbar.

Summary

A spot reaction for phosphorus is decribed. It is based on the formation of quinoline phosphomolybdate on a circular filter paper impregnated with a solution of quinoline molybdate. The identification limit is 1 μg P^{5+}. The reagent paper is easily prepared and keeps well.

Résumé

Description d'une réaction à la touche relative au phosphore, basée sur la formation de molybdophosphate de quinoleïne sur un papier de filtre rond imprégné d'une solution de molybdate de quinoleïne. La limite de sensibilité correspond à 1 μg P^{5+}. Le papier réactif est facile à préparer et se conserve bien.

Literatur

[1] *H. N. Wilson*, Analyst **76**, 65 (1951).
[2] *U. Fernlund* und *S. Zechner*, Z. analyt. Chem. **145**, 111 (1955).
[3] *U. Fernlund*, *S. Zechner* und *R. Olofsson*, Jernkont. Ann. **140**, 386 (1956).
[4] *U. Fernlund*, *S. Zechner* und *S.-O. Eriksson*, Jernkont. Ann. **140**, 389 (1956).

Aus dem Institut für anorganische und analytische Chemie der Universität Graz

Metallfällungen mit Mono- und Diphenylarsinsäure

Von

R. Pietsch

(Eingegangen am 2. November 1956)

Entsprechend der von *F. Feigl*[1] entwickelten Anschauung über die Gruppenwirkung in organischen Verbindungen ist zu erwarten, daß sich bei der Gegenüberstellung des analytischen Verhaltens von Phenylarsinsäure und Diphenylarsinsäure interessante Beobachtungen ergeben. Unterschiede sind einerseits aus der verschieden weitgehenden Substituierung der Arsensäure zu erwarten; anderseits werden auch gewisse Ähnlichkeiten durch die gleiche wirksame Gruppe anzunehmen sein.

Die Phenylarsinsäure wurde schon wiederholt zu quantitativen Fällungen herangezogen, wie beispielsweise für Zirkonium[2,3], Thorium[2,3], Zinn[4], Wismut[5], Niob und Tantal[6]; jedoch sind in der Literatur kaum Hinweise auf das Verhalten der Säure gegenüber anderen Metallen zu finden bzw. nur sehr schwer zugänglich[7]. Diphenylarsinsäure wurde analytisch bisher noch kaum verwendet; dies dürfte wohl in der etwas schwierigeren Herstellung seinen Grund haben.

Bei den folgenden Versuchen wurde Phenylarsinsäure p. a. der Firma Merck verwendet. Die Diphenylarsinsäure wurde nach *H. Bart*[8] hergestellt. Ihr Schmelzpunkt lag etwas tiefer als in der Literatur angegeben, war aber nach mehrmaligem Umkristallisieren konstant. Der bei der Analyse gefundene Arsengehalt stimmte mit dem theoretisch errechneten überein. Von beiden Säuren wurden 0,02-m Lösungen verwendet, wobei ein etwa 15facher Überschuß des Fällungsmittels gegenüber der Metallionenkonzentration vorlag.

Phenylarsinsäure

Als Reagenslösung diente eine verd. wäßrige Lösung. In der nachstehenden Tabelle werden die Fällungseigenschaften der Säure gegenüber einigen Metallionen angegeben.

Tabelle 1

Metallion	Farbe des Niederschlages	p_H bei Fällungsbeginn	Bemerkung
Be^{2+}	weiß	6	quantitativ
Mg^{2+}	weiß	7,5	quantitativ
Ca^{2+}	weiß	10	nicht quantitativ
Sr^{2+}	keine Reaktion		
Ba^{2+}	keine Reaktion		
Al^{3+}	weiß	2	quantitativ
Y^{3+}	weiß	2	quantitativ
La^{3+}	weiß	2	quantitativ
Ce^{3+}	weiß	2	quantitativ
Ti^{4+}	weiß	1	quantitativ
Zr^{4+}	weiß	< 1	quantitativ
Th^{4+}	weiß	1	quantitativ
V^{5+}	keine Reaktion		
Cr^{3+}	blaugrün	2,5	quantitativ
Cr^{6+}	keine Reaktion		
Mo^{6+}	keine Reaktion		
W^{6+}	keine Reaktion		
UO_2^{2+}	gelblich	1,5	quantitativ
Mn^{2+}	weiß	3	quantitativ
Fe^{2+}	grün	1	quantitativ
Fe^{3+}	gelblich	1	quantitativ
Co^{2+}	violett	3	quantitativ
Ni^{2+}	gelbgrün	5	quantitativ
Ru^{3+}	alkalisch Aufhellung		
Rh^{3+}	keine Reaktion		
Pd^{2+}	keine Reaktion		
Ir^{4+}	alkalisch Aufhellung		
Pt^{4+}	keine Reaktion		
Cu^{2+}	bläulichweiß	2	quantitativ
Ag^{+}	weiß	4	quantitativ
Au^{3+}	keine Reaktion		
Zn^{2+}	weiß	2,5	quantitativ
Cd^{2+}	weiß	3	quantitativ
Hg^{+}	gelblichweiß	1	quantitativ
Hg^{2+}	weiß	1	quantitativ
In^{3+}	weiß	1	quantitativ
Tl^{+}	keine Reaktion		
Sn^{2+}	weiß	1	quantitativ
Sn^{4+}	weiß	1	quantitativ
Pb^{2+}	weiß	4	quantitativ
Bi^{3+}	weiß	< 1	quantitativ

Die Niederschläge zeigen mehr oder weniger alle die Farbe der betreffenden Metallionen. Sie sind mit Ausnahme des Zinn-Niederschlages stets gut filtrierbar. Bei Zugabe des Reagens zur Metallsalzlösung fallen die Niederschläge von Ca und Ag meist kristallin aus, während beim

Tabelle 2

Metallion	Farbe des Niederschlages	p_H bei Fällungsbeginn	Bemerkung
Be^{2+}	weiß	3	quantitativ
Mg^{2+}	weiß	8	nicht quantitativ
Ca^{2+}	keine Reaktion		
Sr^{2+}	keine Reaktion		
Ba^{2+}	keine Reaktion		
Al^{3+}	weiß	3	quantitativ
Y^{3+}	weiß	2,5	quantitativ
La^{3+}	weiß	3,5	quantitativ
Ce^{3+}	weiß	4,5	quantitativ
Ti^{4+}	weiß	1	quantitativ
Zr^{4+}	weiß	< 1	quantitativ
Th^{4+}	weiß	1	quantitativ
V^{5+}	gelb	5 und darunter	quantitativ
Cr^{3+}	grün	3	quantitativ
Cr^{6+}	keine Reaktion		
Mo^{6+}	weiß	4 und darunter	quantitativ
W^{6+}	weiß	4 und darunter	quantitativ
UO_2^{2+}	weiß	< 1	quantitativ
Mn^{2+}	weiß	4	quantitativ
Fe^{2+}	grün	2	quantitativ
Fe^{3+}	weißgelb	< 1	quantitativ
Co^{2+}	dunkelblau	4,5	nicht quantitativ, nur in konz. Lösungen
Ni^{2+}	weiß	5,0	quantitativ
Ru^{3+}	alkalisch Aufhellung		
Rh^{3+}	keine Reaktion		
Pd^{2+}	braun	3	quantitativ
Ir^{4+}	alkalisch Aufhellung		
Pt^{4+}	keine Reaktion		
Cu^{2+}	blau	4	quantitativ
Ag^{+}	lichtbraun	7	quantitativ
Au^{3+}	hellgelb	3	nur in konz. Lösungen
Zn^{2+}	weiß	3,5	quantitativ
Cd^{2+}	weiß	6	quantitativ
Hg^{+}	weiß	2,5	quantitativ
Hg^{2+}	weiß	3	nicht quantitativ
In^{3+}	weiß	1	quantitativ
Tl^{+}	keine Reaktion		
Sn^{2+}	weiß	1	quantitativ
Sn^{4+}	weiß	< 1	quantitativ
Pb^{2+}	weiß	5	nicht quantitativ
Bi^{3+}	weiß	1	quantitativ

Alkalisieren gemeinsamer saurer Lösungen von Metallion und Säure durchwegs flockige und mitunter pulverige Niederschläge entstehen.

Bei extremen Abweichungen der angewendeten Konzentrationen des Reagens und der Metallionen ergeben sich entsprechende Verschiebungen der p_H-Werte bei Fällungsbeginn.

Diphenylarsinsäure

Als Reagenslösung wurde eine verd. wäßrige Lösung der Säure verwendet. Die vorstehende Tabelle 2 gibt in groben Umrissen die Fällungseigenschaften der Diphenylarsinsäure gegenüber Metallionen wieder. Es sind in der Regel flockige Niederschläge mit den den jeweiligen Metallionen eigenen Farben.

Die Niederschläge sind bis auf die von W^{6+}, Fe^{2+}, Sn^{2+} und Sn^{4+} flockig und gut filtrierbar, diejenigen von Co^{2+} und Cu^{2+} pulverig. Bemerkt soll auch werden, daß sich die Niederschläge von Au^{3+} und Sn^{2+}, die sich nur in konz. Lösungen bilden, beim Erhitzen in der Fällungslösung schmelzen lassen. Es ist dies eine Erscheinung, die bisher bei Arsinsäurefällungen nicht beobachtet werden konnte.

In der Tabelle 3 sind die Metallionen nach dem p_H ihres jeweiligen Fällungsbeginnes zusammengestellt.

Tabelle 3

Fällungs-p_H	Phenylarsinsäure	Diphenylarsinsäure
1	Zr^{4+}, Th^{4+}, Bi^{3+} Ti^{4+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Hg^{1+} In^{3+}, Sn^{2+}, Sn^{4+}, Hg^{2+}	Zr^{4+}, UO_2^{2+}, Fe^{3+}, Sn^{4+} Ti^{4+}, Th^{4+}, In^{3+} Sn^{2+}, Bi^{3+}
2	UO_2^{2+} Al^{3+}, Y^{3+}, La^{3+} Ce^{3+}, Cu^{2+}	Fe^{2+}
3	Cr^{3+}, Zn^{2+} Mn^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+}	$Yg^{3+}H^{1+}$, Be^{2+}, Al^{3+}, Cr^{3+}, Pd^{+2} $(Au^{3+}$, $Hg^{2+})$
4	Ag^{1+}, Pb^{2+}	La^{3+}, Zn^{2+} Mo^{6+}, W^{6+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}
5	Ni^{2+}	Ce^{3+} (Co^{2+}) V^{5+}, Ni^{2+} (Pb^{2+})
6	Be^{2+}	Cd^{2+}
7	Mg^{2+}	Ag^{1+}
8		(Mg^{2+})

Bei Betrachtung der Tabelle 3 lassen sich grundsätzlich drei Gruppen von Metallen unterscheiden, deren Verhalten gegenüber den beiden Arsinsäuren analoge Verschiedenheiten erkennen läßt.

Der ersten Gruppe von Metallen, deren Fällungsbeginn beim Übergang von Phenylarsinsäure zu Diphenylarsinsäure keine oder zumindest keine

nennenswerte Veränderung erfährt, gehören die Metalle Zr, Th, Sn, Bi, Y, Cr, Ni, Ti, Fe(III) und In an. Bei diesen Metallen scheint weder die Anzahl der Phenylgruppen noch die dadurch bedingte Veränderung des anorganischen Teiles der Substanz eine große Rolle zu spielen. Im Gegensatz dazu sind bei den folgenden beiden Gruppen deutliche Veränderungen sowohl bei der Lage des Fällungsbeginnes als auch bei der Art des Ausfallens festzustellen.

Bei den Metallen Hg, Cd, Ce, Ag, Zn, Fe(II), La, Cu, Ca, Mn, Co, Pb, Al und Mg tritt nach Einführung der zweiten Phenylgruppe eine mehr oder weniger starke Erhöhung der p_H-Werte des Fällungsbeginnes auf. Außerdem lassen sich auch die Fällungen von Hg, Co, Pb und Mg nicht so leicht quantitativ durchführen, wie dies bei Phenylarsinsäure der Fall ist.

Am augenscheinlichsten wird hingegen die Änderung der analytischen Eigenschaften bei der dritten Gruppe von Metallen, und zwar bei Be, V, Mo und W.

Bei Be liegt der Beginn des Ausfallens mit Diphenylarsinsäure in einem wesentlich stärker sauren Bereich als bei Phenylarsinsäure, wobei die Erscheinungen der Fällung selbst völlig normal sind, so daß also die Stärke der Fällung vom Beginn des Ausfallens an mit zunehmendem p_H-Wert größer wird. Bei den Metallsäuren von V, Mo und W hingegen, die mit Phenylarsinsäure überhaupt nicht reagieren, nimmt vom p_H-Wert ihres Fällungsbeginnes an das Ausmaß der Fällung mit abnehmenden p_H-Werten zu, was Rückschlüsse auf die Natur der entsprechenden Fällungen zuläßt.

Zusammenfassung

Es werden Mitteilungen über das qualitative Verhalten von Phenylarsinsäure und Diphenylarsinsäure gegenüber Metallionen gemacht. Die Lage der p_H-Werte bei Fällungsbeginn wird angegeben und die Unterschiede im Verhalten der verschiedenen Metalle gegen Phenylarsinsäure und Diphenylarsinsäure aufgezeigt.

Summary

Reports are given regarding the qualitative behavior of phenylarsinic and diphenylarsinic acid toward metal ions. The p_H values at the beginning of the precipitation are given and the differences in the behavior of the various metals toward these reagents is given.

Résumé

Communications sur le comportement qualitatif des acides phénylarsonique et diphénylarsonique en présence d'ions métalliques. L'auteur indique l'influence de la valeur du p_H lors de la précipitation commençante et signale les différences de comportement des différents métaux réagissant sur ces deux acides.

Literatur

[1] *F. Feigl*, Chemistry of Specific, Selective and Sensitiv Reactions. New York: Academic Press. 1949.

[2] *A. Rice, H. Fogg* und *C. James*, J. Amer. Chem. Soc. **48**, 895 (1926).

[3] *J. P. Alimarin* und *O. A. Medvedeva*, Zavodskaya Lab. **11**, 254 (1945); zitiert nach Chem. Abstr. **40**, 1418 (1946).

[4] *J. S. Knapper, K. Craig* und *G. C. Chandlee*, J. Amer. Chem. Soc. **55**, 3945 (1933).

[5] *A. K. Majumdar*, J. Ind. Chem. Soc. **21**, 119, 187, 188 (1944); **22**, 313 (1945).

[6] *J. P. Alimarin* und *B. I. Fried*, Mikrochem. **23**, 17 (1937).

[7] *A. I. Portnov*, J. Gen. Chem. **18**, 494 (1948); zitiert nach Chem. Abstr. **43**, 57 (1949).

[8] *H. Bart*, Ann. Chem. **429**, 100 (1922).

Aus dem Institut für organische Chemie der Universität Ljubljana, Jugoslawien

Beitrag zur Bestimmung von Morphin in Mohnkapseln

Von

A. Bratina, M. Perpar und **M. Tišler**

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 8. November 1956)

Für die quantitative Ermittlung des Morphingehaltes von Mohnkapseln sind mehrere Methoden bekannt, die sich üblicherweise auf die Isolierung von Morphin und die nachfolgende Bestimmung mit Hilfe ausgewählter analytischer Methoden gründen. Für die Isolierung von Morphin aus Mohnkapseln sind viele Methoden bekannt[12]. Einige empfindliche Verfahren benutzen die Extraktion mit Lösungsmitteln. Einige Autoren bestimmen Morphin in Mohnkapseln gravimetrisch mit 4-Chlor-1,3-dinitrobenzol[21,22] nach der von *Mannich*[19,20] eingeführten Methode, andere haben verschiedene chromatographische Verfahren[6,15,25,26] benutzt und auch polarographische Methoden[5,13] sind bekannt.

Der basische Charakter der Opiumalkaloide gab die Anregung für die Verwendung von Ionenaustauschern für die Trennung des Morphins von anderen Begleitstoffen vor der Analyse des Morphingehaltes. Ionenaustauscher wurden erfolgreich für die Trennung von Kodein von Morphin[1,10] oder für die Bereitung reinen Morphins aus seinen Salzen[14,18,29] verwendet. *Grant* und *Hilty*[10] haben für die Trennung von Morphin und Kodein den Ionenaustauscher Amberlite XE 75 verwendet; *Jindra*[14] hat die Verwendbarkeit des Ionenaustauschers Amberlite IR-4 B untersucht, konnte jedoch nur ungefähr 75% Morphinhydrochlorid regenerieren. *Achor* und *Geiling*[1] haben die Isolierung und Reinigung von Semimikromengen Morphin beschrieben und die besten Resultate wurden mit den Ionenaustauschern Nalcite SAR und Amberlite IRC-50 erreicht. Andere stark basische Ionenaustauscher haben sich für die Abtrennung des Morphins nicht bewährt[10], da ein zu großes Volumen für die Regenerierung des Alkaloids notwendig ist. *Hamlow* und Mitarbeiter[11] fanden Amberlite IR-120 und Amberlite IRA-410 als vielversprechend für die Bestimmung

des Morphins in Opium, unsere Versuche haben jedoch gezeigt, daß im besten Falle 94% Morphin zurückgewonnen werden konnten. Eine gute Methode zur Bestimmung des Morphins in Mohnkapseln unter Verwendung von Ionenaustauschern Dowex 50 und Dowex 1 hat *Van Etten*[31] beschrieben.

Da man bei der Extraktion mit Wasser oder organischen Lösungsmitteln neben Morphin immer noch andere Begleitstoffe erhält, die die quantitative Bestimmung des Morphins stören, ist es am besten, die Säuren, Basen und neutralen Stoffe stufenweise unter Verwendung von Ionenaustauschern zu entfernen. *Van Etten*[30] hat die Bedingungen festgestellt, unter denen man Morphin quantitativ aus starken Kationen- und Anionenaustauschern eluieren kann. Dabei spielen neben anderen Faktoren für die quantitative Zurückgewinnung des Morphins besonders die Quervernetzung des Ionenaustauschers und das p_H des Eluierungsmittels eine große Rolle. Er hat festgestellt, daß die Eluierung nur bei denjenigen Kationenaustauschern vollständig war, die 1, 2 oder 4% Divinylbenzol enthalten, bei Anionenaustauschern aber nur bei denjenigen mit 1% Divinylbenzol. Als Eluierungsmittel haben sich Lösungen von Ammoniak und Natriumhydroxyd bewährt, bei den Anionenaustauschern wurden gute Resultate mit Essigsäure erhalten, da diese das p_H des Mediums unter den isoelektrischen Punkt des Morphins, der bei 8,94 liegt, erniedrigt. Dabei wird Morphin quantitativ aus der Kolonne eluiert und bei Einwaagen von 5 bis 20 mg Morphin wurden 97.2 bis 98,6% zurückgewonnen[31]. Auch andere Autoren[16,17] haben den Austausch mit Ionenaustauschern verschiedener Quervernetzung studiert und festgestellt, daß die Molekulargröße das Gleichgewicht und die Geschwindigkeit des Austausches beeinflußt.

Bei unseren Versuchen haben wir folgende Ionenaustauscher verwendet und geprüft: Kationenaustauscher Amberlite IR-120, Lewatit S 100, Zerolit (mit 2% Divinylbenzol) und Anionenaustauscher Amberlite IRA-410, Lewatit MN und De Acidite FF. Wir verwendeten eine Mikrokolonne[24] (8 cm hoch und 0,8 cm im Durchmesser), 5 bis 6 cm hoch mit einer wäßrigen Suspension von Ionenaustauschern gefüllt.

Zuerst haben wir Versuche mit reinem Morphin (10 mg in 25 ml Wasser) durchgeführt, und zwar zuerst mit einzelnen Ionenaustauschern, dann aber mit einer Kombination von Kationen- und Anionenaustauschern. Alle durchgeführten Messungen sind als Mittelwerte mehrerer Versuche angeführt. Die Resultate bei Anwendung von Amberlite sind in der Tabelle 1 angegeben. Die Wiedergewinnung des Morphins konnte auch bei zunehmender Konzentration von Ammoniak oder Essigsäure nicht verbessert werden. Nach Aufbringen der Morphinlösung auf drei Austauschersäulen (Amberlite IR-120 in der H-Form, Amberlite IRA-410 in OH-Form und Amberlite IR-120 in Na-Form) und Elution der ersten

Säule mit 0,5-n Ammoniak, der zweiten mit 1,0-n Essigsäure und der dritten mit 0,02-n Boratpuffern[31], konnte mit Pufferlösung vom p_H 8,6 5% Morphin und mit Pufferlösung vom p_H 9,4 50% Morphin gewonnen werden. Daraus folgt, daß die beiden Ionenaustauscher Amberlite IR-120 und Amberlite IRA-410 für die Analyse nicht anwendbar sind, weil das Eluat mit Pufferlösung p_H 8,6 kein Morphin enthalten dürfte, mit Pufferlösung p_H 9,4 konnte es aber nur unvollkommen eluiert werden. Die

Tabelle 1

Verwendeter Ionenaustauscher	Wiedergewinnung von Morphin in %	Eluierungsmittel
Amberlite IR-120 in H-Form	88%	0,5-n Ammoniak
Amberlite IRA-140 in OH-Form	67%	0,3-n Essigsäure
	94%	1,0-n Essigsäure

größten Verluste an Morphin entstehen in der dritten Säule, die zwecks Entfernung aller vorher nicht adsorbierten Begleitstoffe verwendet werden muß. Bei Verwendung einer Pufferlösung mit niedrigerem p_H wurde zwar der Prozentgehalt von Morphin im Eluat erniedrigt, jedoch würde das später bei der Analyse stören, da man auf diese Weise die verwandten Alkaloide nicht vollständig entfernen kann.

Bei den Versuchen mit Lewatit-Austauschern wurden wieder drei Säulen verwendet: die erste mit Lewatit S 100 in H-Form, die zweite

Tabelle 2

Verwendeter Ionenaustauscher	Wiedergewinnung von Morphin in %	Eluierungsmittel
Zerolit (2% DVB)* in H-Form	100%	0,5-n Ammoniak
De Acidite FF in OH-Form	99%	1,0-n Essigsäure

* DVB = Divinylbenzol.

mit Lewatit MN in OH-Form und die dritte mit Lewatit S 100 in der Na-Form. Sie wurden mit den gleichen Lösungsmitteln wie bei den Amberliten eluiert. Unter Verwendung einer 0,02-n Pufferlösung mit p_H 8,6 wurde kein Morphin erhalten, mit der Pufferlösung vom p_H 9,4 aber 76%. Da die Zurückgewinnung des Morphins unvollständig ist, sind auch diese beiden Ionenaustauscher für die Analyse nicht brauchbar.

Mit Zerolit-Austauschern (mit 2% Divinylbenzol) und De Acidite FF wurden gute Resultate erhalten; sie sind in der Tabelle 2 angegeben und zeigen, daß man Morphin vollständig zurückgewinnen kann. Wenn Morphin noch durch die dritte Säule (Zerolit in Na-Form) gegossen

wurde, konnte es unter Verwendung von 0,07-n Boratpuffern praktisch quantitativ eluiert werden, wie aus der Tabelle 3 hervorgeht. Das letzte Resultat liegt im Bereich der Fehlergrenze und ist noch besser als das für dieselbe Konzentration und unter Verwendung von Dowex-Austauschern[31] erhaltene. Daher sind diese beiden Ionenaustauscher für die Analyse gut verwendbar; wir haben sie bei allen folgenden Analysen unter Berücksichtigung der gewonnenen Erfahrungen verwendet.

Tabelle 3

Verwendeter Ionenaustauscher	Normalität des Boratpuffers	pH des Puffers	Zurückgewinnung von Morphin in %
Zerolit (2% DVB) in Na-Form.....	0,02	8,6	0,0
		9,4	65,0
	0,05	8,6	0,0
		9,4	80,0
	0,07	8,6	0,0
		9,4	98,5

Für die kolorimetrische Bestimmung des Morphins sind viele Methoden bekannt[27]; am meisten verwendet wird die Bildung von Nitrosomorphin und Messung der Orange-Färbung in alkalischer Lösung[2,3,4,7,8,22,23,28]. Die Reaktion stören nicht Kodein, Narcein, Papaverin, Thebain, Narkotin; gestört wird sie aber von Mekonsäure sowie Laudanin und Codamin, die in kleinen Mengen in Mohnkapseln vorkommen[4].

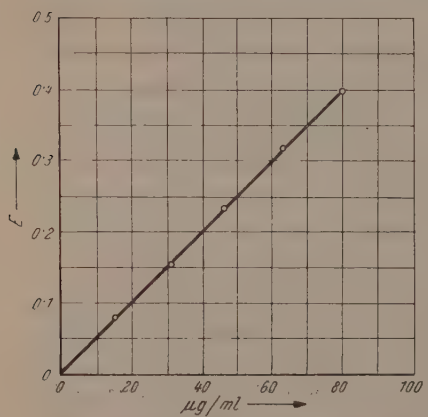


Abb. 1. Eichkurve für die Morphinbestimmung

Wir haben für die kolorimetrische Morphinbestimmung die Methode nach *Adamson* und *Handisyde*[2] herangezogen. Die Messungen der Farbintensität wurden mit dem lichtelektrischen Universalkolorimeter nach Dr. B. Lange unter Verwendung von 1-cm-Küvetten und des Farbfilters BG-7 durchgeführt. In der Abb. 1 ist die erhaltene Eichkurve für Morphinkonzentrationen von 0 bis 80 µg/ml angegeben, aus der ersichtlich ist, daß das Beersche Gesetz voll erfüllt ist.

Bei der Extraktion von Morphin aus Mohnkapseln spielt auch das Lösungsmittel eine bemerkenswerte Rolle. Obwohl für die Extraktion der Opiumalkaloide saures Medium als überlegen angesehen wird[9], haben wir festgestellt, daß sich Wasser am besten bewährt, wie aus der Tabelle 4 ersichtlich ist.

Tabelle 4

Für die Extraktion von Mohnkapseln verwendetes Lösungsmittel	Morphingehalt in %
1,0-n HCl	0,18
2% H_2SO_3	0,27
4% H_2SO_3	0,23
Wasser	0,32

Auf Grund aller dieser Versuche ergibt sich folgendes Verfahren zur Bestimmung von Morphin in Mohnkapseln; mit dessen Hilfe erhielten wir auch übereinstimmende Resultate nach der Methode von *Van Etten*[31].

Ausführung: 5 g feingemahlene reife Mohnkapseln (ohne Stengel, Opium und Samen wurden vorher entfernt), deren Wassergehalt vorher bestimmt wurde, wurden mit 200 ml Wasser in einem Soxhletapparat 5 Stunden extrahiert. Der Extrakt wird in einen 250-ml-Meßkolben filtriert und mit dest. Wasser zur Marke aufgefüllt. 50 ml dieser Lösung läßt man durch die vorbereiteten Ionenaustauschersäulen fließen. Die erste Säule enthält Zerolit (mit 2% Divinylbenzol) in H-Form (vorbereitet durch Auswaschen mit 10 ml 3-n HCl und danach mit entionisiertem Wasser bis zur neutralen Reaktion), die zweite Säule enthält De Acidite FF in OH-Form (vorbereitet durch Auswaschen mit 10 ml 1-n NaOH und danach mit entionisiertem Wasser bis zur neutralen Reaktion); die letzte Säule enthält Zerolit (mit 2% Divinylbenzol) in Na-Form (vorbereitet durch Auswaschen mit 10 ml 1-n NaOH und danach mit entionisiertem Wasser bis zur neutralen Reaktion). Die Mikrosäulen waren mit der wäßrigen Suspension von Ionenaustauschern 5 bis 6 cm hoch gefüllt. Nachdem 50 ml durch die erste Säule geflossen waren, wurde noch mit 5 ml entionisiertem Wasser ausgewaschen und dann mit 50 ml 0,5-n Ammoniak eluiert. Das Eluat wird danach auf die zweite Säule gegossen, mit 5 ml entionisiertem Wasser gespült und mit 50 ml 1-n Essigsäure eluiert. Das Eluat wird mit 1 ml 1-n HCl angesäuert, auf dem Wasserbade bis zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 10 ml Wasser gelöst und auf die dritte Säule gebracht. Diese wird dann mit 5 ml Wasser gespült, mit 50 ml einer Boratpufferlösung vom p_H 8,6 ausgewaschen und danach mit 225 ml einer Boratpufferlösung vom p_H 9,4 eluiert. Das erste Eluat wird verworfen und dem zweiten werden 3 ml 3-n HCl zugesetzt, die Lösung auf dem Wasserbade auf ungefähr 30 ml

Tabelle 5

Muster Nr.	Wassergehalt %	Morphingehalt
1	10,86	0,32
2	9,83	0,23
3	9,45	0,29

eingedampft und quantitativ in einen 50-ml-Meßkolben übertragen. Nach Durchführung der Nitrosoreaktion[2] wird bis zur Marke mit Wasser gefüllt und 10 ml mit dem lichtelektrischen Universalkolorimeter nach Dr. B. Lange kolorimetriert.

In der Tabelle 5 sind die Analysen einiger Mohnkapseln jugoslawischer Herkunft angeführt (der Morphingehalt ist auf die trockene Substanz berechnet).

Zusammenfassung

Es wird eine Methode zur Bestimmung des Morphingehaltes von Mohnkapseln beschrieben. Nach der Extraktion werden die Begleitstoffe aus dem Extrakt mit Hilfe von Ionenaustauschern entfernt und reines Morphin erhalten, das dann kolorimetrisch bestimmt wird. Versuche mit den Ionenaustauschern Amberlite IR-120, Amberlite IRA-410, Lewatit S 100 und Lewatit MN gaben zu niedrige Werte, da das Morphin nicht vollständig zurückgewonnen werden kann. Am besten bewährten sich die Ionenaustauscher Zerolit (mit 2% Divinylbenzol) und De Acidite FF, aus denen Morphin in 98,5%iger Ausbeute zurückgewonnen wurde. Die Methode wurde an einigen Mustern von Mohnkapseln geprüft; die Resultate stehen in Übereinstimmung mit den nach der Methode von *Van Etten* erhaltenen.

Summary

A method is given for the determination of the morphine content of poppy heads. After the extraction, the accompanying materials are removed from the extract by means of ion exchangers and pure morphine is obtained, which is then determined colorimetrically. Trials with Amberlite IR-120, Amberlite IRA-410, Lewatite S 100, and Lewatite MN gave too low results, because the morphine can not be completely recovered. Zerolite (with 2% of divinylbenzene) and De Acidite FF were found to be the most efficient ion exchangers; 98% of the morphine was recovered from them. The method was tested on several samples of poppy capsules. The results agreed with those obtained by the *Van Etten* procedure.

Résumé

Description d'une méthode de détermination de la teneur en morphine des capsules de pavot. Après extraction on élimine les substances qui accompagnent la morphine par traitement de l'extrait à l'aide d'un échangeur d'ions; on obtient ainsi de la morphine pure que l'on dose par colorimétrie.

Des essais effectués avec des échangeurs d'ions tels que l'amberlite IR-120, l'amberlite IRA-410, la lewatite S 100 et la lewatite MN ont fourni des résultats trop faibles du fait de la récupération non quantitative de la morphine.

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la zerolite (à 2% de divinylbenzène) et la De acidite FF qui permettent de récupérer la morphine avec un rendement de 98%. La présente méthode a été éprouvée sur quelques échantillons de capsules de pavot; les résultats obtenus concordent avec ceux qui sont fournis par la méthode de *Van Etten*.

Literatur

[1] *L. B. Achor* und *E. M. K. Geiling*, Analyt. Chemistry **26**, 1061 (1954).
[2] *D. C. M. Adamson* und *F. P. Handisyde*, Analyst **70**, 305 (1945).
[3] *B. Akačić*, *D. Marković* und *J. Petričić*, Acta Pharm. Jug. **1**, 3 (1951).
[4] *H. Baggesgaard-Rasmussen*, Ann. pharm. franç. **10**, 693 (1952).
[5] *H. Baggesgaard-Rasmussen* und *O. Lanng*, Dansk Tidsskr. Farmac. **22**, 201 (1948).
[6] *M. L. Borke* und *E. R. Kirch*, J. Amer. Pharm. Assoc. **42**, 627 (1953).
[7] *J. S. N. Cramer* und *J. G. Voerman*, Acta Pharm. Intern. **1**, 219 (1950).
[8] *A. Denoël*, J. pharm. Belgique **1**, 241 (1946).
[9] *R. Eder* und *W. Stucki*, Pharm. Acta Helv. **7**, 259 (1932).
[10] *E. W. Grant* und *W. W. Hilty*, J. Amer. Pharm. Assoc. **42**, 150 (1953).
[11] *E. E. Hamlow*, *H. G. DeKay* und *E. Ramstad*, J. Amer. Pharm. Assoc. **43**, 460 (1954).
[12] *T. A. Henry*, The Plant Alkaloids. London: Churchill. 1949. S. 176.
[13] *J. Holubek*, Pharm. Zentralhalle **94**, 347 (1955).
[14] *A. Jindra*, J. Pharm. Pharmacol. **1**, 87 (1949).
[15] *F. C. Klee* und *E. R. Kirch*, J. Amer. Pharm. Assoc. **42**, 146 (1953).
[16] *T. R. E. Kressman*, J. Phys. Chem. **56**, 118 (1952).
[17] *R. Kunin* und *R. J. Myers*, Discussions Faraday Soc. **7**, 114 (1949).
[18] *L. Levi* und *C. G. Farmillo*, Canad. J. Chem. **30**, 793 (1952).
[19] *C. Mannich*, Arch. Pharm. **273**, 97, 199 (1935).
[20] *C. Mannich*, Arch. Pharm. **280**, 386 (1942).
[21] *W. Poethke* und *E. Arnold*, Pharm. Zentralhalle **88**, 1 (1949).
[22] *W. Poethke* und *E. Arnold*, Pharm. Zentralhalle **90**, 145 (1951).
[23] *J. F. Reith* und *A. W. M. Indemans*, Pharm. Weekbl. **85**, 309 (1950).
[24] *O. Samuelson*, Ion Exchangers in Analytical Chemistry. New York: Wiley. 1953. S. 80.
[25] *V. Sapara*, Časopis českeho Lekarnictva, vědecka Přiloha **63**, 293 (1950).
[26] *O. E. Schultz* und *D. Strauss*, Apothek.-Ztg. **95**, 642 (1955).
[27] *F. D. Snell* und *C. T. Snell*, Colorimetric Methods of Analysis. New York: Van Nostrand. 1954. S. 454.
[28] *A. B. Svendsen*, Dansk Tidsskr. Farmac. **22**, 131 (1948).
[29] *C. H. Van Etten* und *M. B. Wiele*, Analyt. Chemistry **25**, 1109 (1953).
[30] *C. H. Van Etten*, Analyt. Chemistry **27**, 954 (1955).
[31] *C. H. Van Etten*, *F. R. Earle*, *T. A. Mc Guire* und *F. R. Senti*, Analyt. Chemistry **28**, 867 (1956).

Aus dem II. Chemischen Institut der Universität Wien

Spektralanalytische Untersuchungen zur urgeschichtlichen Problematik

Von

J. Derkosch und H. Neuninger

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 8. November 1956)

In Weiterführung der von uns (gemeinsam mit *F. X. Mayer* †) begonnenen Untersuchungen zum Problem des urzeitlichen Kupferbergbaues[1] soll hier über neue Ergebnisse berichtet werden.

I

Zu den großen Schwierigkeiten, die bei den Versuchen auftreten, zwischen urzeitlichen Kupferfunden und Kupfererzen aus urzeitlich abgebauten Lagerstätten Beziehungen herzuleiten, gesellte sich im Fall der Lagerstätte Kelchalm bei Kitzbühel (Tirol) ein weiteres Hindernis. Es bestand darin, daß bei der spektrographischen Analyse verschiedener ausgegrabener Fertigobjekte aus Kupfer bzw. Bronze bei einer Anzahl dieser Objekte die Elemente Antimon, Arsen und Wismut verstärkt auftraten, während bei der Untersuchung von Kupferkiesen aus dieser Lagerstätte speziell Wismut überhaupt nicht und Antimon und Arsen nur fallweise in Spuren nachgewiesen werden konnten. Da es aber sehr unwahrscheinlich ist, daß die Fertigobjekte aus anderen Gegenden in die Bergbaugebiete importiert wurden — dagegen sprechen die zahlreichen aufgefundenen Aufbereitungsanlagen und Schmelzplätze in der engsten Umgebung des Bergbaues —, konnte das Auftreten dieser Elemente durch die Annahme einer zufälligen oder absichtlichen Zufügung eines bisher nicht bekannten bzw. untersuchten Erzes oder Metalles zur Schmelze nur sehr mangelhaft erklärt werden.

Im Rahmen der im Jahre 1956 von Universitätsprofessor Dr. *R. Pittioni* durchgeführten Geländebegehungen im Gebiet Kelchalm und Umgebung wurden nun neuerlich Proben gesammelt. Es handelte sich

dabei um Schlacken, Kupferkiese und Erzproben, die mineralogisch als Vergesellschaftung von Kupferkies mit Fahlerzen deutbar sind. Die letzteren stammten im wesentlichen vom (vielleicht urzeitlich abgebauten)* Kupferbergbau Hechenmoos-Grünthal (4 Proben), zwei weitere Proben wurden auf dem Henlabjoch (östlich des urzeitlichen Schurfgebietes Kelchalm) aufgelesen (s. beistehenden Orientierungsplan).

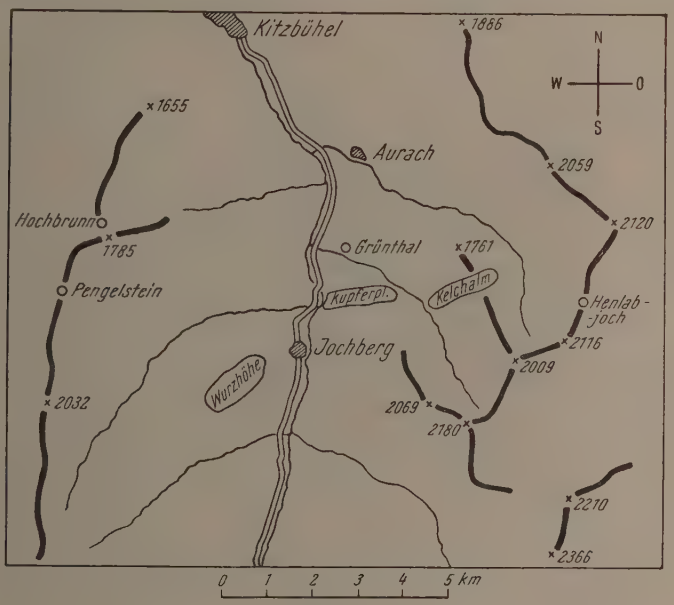


Abb. 1.

Da die äußerliche Ähnlichkeit von Kupferkies und Fahlerz in der sich hier zeigenden Vergesellschaftung (es scheint sich um nestartige Ausläufer des Fahlerzvorkommens Hochbrunn-Pengelstein bei Kitzbühel zu handeln) sehr groß ist, liegt der Schluß nahe, daß auch wechselnde Mengen Fahlerz mit in die urzeitliche Schmelze gelangten. Durch diesen Fahlerzanteil könnte das Auftreten der Elemente Antimon, Arsen und Wismut in den Fertigobjekten zwanglos erklärt werden, da diese Elemente als charakteristische Bestandteile der Fahlerze anzusehen sind. Der Nachweis dieser drei Elemente in den vorliegenden Erzen würde diese Deutung erlauben. Die relativ breite Streuung in den Konzentrationsverhältnissen dieser Elemente ließe sich dann durch die bekanntlich stark wechselnde

* Nach einer mündlichen Mitteilung von Univ. Prof. Dr. *R. Pittioni*, Wien.

Tabelle 1.

Erz	Fundort	Probe Nr.	Ag	Al	As	Au	Bi
Kupferkies	Kelchalm, Antonistollen	1	Sp	Sp	Sp	—	—
	„ , Scheidehalde	1	Sp	Sp	Sp	—	—
	„ , „	2	Sp	Sp	Sp	—	—
	Grünthal, rezent	1	Sp	+	Sp	—	—
	„ , „	2	Sp	Sp	Sp	—	—
	„ , „	3	Sp	+	Sp	—	—
	„ , „	4	Sp	+	Sp	—	—
	„ , „	5	Sp	+	Sp	—	—
	Wurzhöhe, Scheidehalde	1	Sp	Sp	Sp	—	—
	„ , „	2	Sp	Sp	+	—	—
	„ , „	3	Sp	Sp	+	—	?
	Kupferplatte, rezent	1	Sp	Sp	?	—	—
	„ , „	2	?	Sp	?	—	—
	„ , „	3	Sp	+	Sp	—	—
	„ , Scheidehalde	1	Sp	+	Sp	—	—
	„ , „	2	Sp	Sp	Sp	—	—
	„ , „	3	Sp	Sp	?	—	—
Kupferkies mit Fahlerz	Grünthal, rezent	1	Sp	Sp	?	—	—
	„ , „	2	Sp	++	Sp	—	Sp
	„ , „	3	Sp	Sp	+	Sp	?
	„ , „	4	Sp	+	Sp	—	?
	Henlabjoch	1	Sp	Sp	?	—	?
	„	2	Sp	Sp	?	—	?
Fahlerz	Röhrerbichl	1	+	Sp	+	—	Sp
	Mitterberg	1	+	Sp	+	—	+

Die Zeichen bedeuten: — nicht nachweisbar; ? nicht sicher nachweisbar; +++ Ansteigende, einwandfrei

Zusammensetzung der Fahlerze erklären, sowie damit, daß die mehr oder minder zufällig in die Schmelze gelangende Menge Fahlerz natürlich von Schmelzung zu Schmelzung verschieden war. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden die Erzproben, sowohl Fahlerze wie auch Kupferkiese, spektrographisch analysiert. Weiters gelangte zu Vergleichszwecken auch je eine Fahlerzprobe aus den Bergbaurevieren Röhrerbichl, nördlich von Kitzbühel, und Mitterberg bei Bischofshofen zur Untersuchung.

Die Analysen wurden mittels eines Gleichstromdauerbogens von 260 V bei 25 Ω Vorwiderstand durchgeführt. Als Trägerelektroden dienten Kohlen Ringsdorff RW-III vom Durchmesser 5 mm mit einer Bohrung von 4 mm Tiefe und 3 mm Durchmesser zur Aufnahme des Probematerials; die angespitzte Gegenelektrode war aus dem gleichen Material. Der Lichtbogen wurde mittels Zwischenabbildung in den Spektrographen (Hilger Automatic Large Quartz and Glass Spectrograph E 478) abgebildet, die Spaltbreite betrug 15 μ. Das Bereich von 3500 bis 2450 Å wurde auf Gevaert Scientia

Erzanalysen

Ca	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Mg	Mn	Ni	Pb	Sb	Si	Sn	Zn
+++	Sp	—	+++	+++	—	++	+	Sp	—	—	+	?	?
+	—	—	+++	+++	—	+	+	—	Sp	—	+	Sp	Sp
+	—	—	+++	+++	—	+	Sp	—	Sp	—	+	Sp	?
+	Sp	—	+++	+++	Sp	+	Sp	Sp	Sp	Sp	++	Sp	?
+	Sp	—	+++	+++	?	+	—	Sp	Sp	?	++	Sp	?
+	Sp	—	+++	+++	?	+	Sp	Sp	Sp	?	++	Sp	Sp
+	?	—	+++	+++	—	+	Sp	Sp	Sp	?	++	Sp	Sp
+	Sp	—	+++	+++	Sp	+	Sp	Sp	Sp	—	++	Sp	Sp
++	Sp	—	+++	+++	—	+	+	+	?	—	++	Sp	?
+	+	—	+++	+++	—	+	—	+	Sp	Sp	++	—	—
+	Sp	—	+++	+++	—	+	Sp	+	Sp	Sp	++	Sp	—
++	?	—	+++	+++	—	+	+	Sp	Sp	?	+	?	?
+	—	—	+++	+++	—	Sp	Sp	—	—	—	Sp	—	—
++	Sp	Sp	+++	+++	—	+	+	Sp	Sp	—	++	Sp	Sp
+	—	?	+++	+++	—	+	+	—	?	—	+	?	?
+	—	?	+++	+++	—	+	+	Sp	Sp	—	+	Sp	Sp
Sp	—	?	+++	+++	—	Sp	+	?	Sp	—	+	Sp	?
+	Sp	—	+	+++	—	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	+++	?	Sp
+	+	—	+	+++	Sp	+	Sp	+	Sp	Sp	+++	Sp	—
+	++	—	++	+++	Sp	+	Sp	+	Sp	+	+++	—	—
+	Sp	—	+++	+++	—	Sp	Sp	+	Sp	?	+++	?	—
+	Sp	—	+++	+++	—	Sp	—	Sp	Sp	?	+++	Sp	—
++	—	—	+++	+++	—	Sp	?	Sp	Sp	?	+++	?	—
+	Sp	—	+++	+++	Sp	+	+	Sp	Sp	++	++	Sp	+
Sp	—	—	+++	+++	+	+	Sp	?	—	+	+	—	++

Sp Spur (zwei letzte Linien schwach, aber eindeutig nachweisbar); +, ++, nachweisbare Mengen.

34 C 50-Platten aufgenommen, die Belichtungszeit betrug eine Minute. Die halbquantitative Auswertung erfolgte mittels Spektrenprojektor durch visuellen Linienvergleich.

Wie die Analysenergebnisse (Tabelle 1) zeigen, führt ein Teil der untersuchten Fahlerze Antimon, Arsen und Wismut in verschiedenen Verhältnissen, während die Kupferkiesproben — in Übereinstimmung mit früheren Erzanalysen[1] — frei von Wismut und zum Teil auch frei von Antimon sind. Wenn diese Fahlerze nun in die Schmelze gelangen, gehen durch die wechselnde Flüchtigkeit der in der Schmelze vorliegenden Antimon-, Arsen- und Wismutverbindungen (Sulfide und später Oxyde) im Verlauf des Konzentrierungs- und Schmelzprozesses verschiedene Anteile dieser Elemente einerseits durch Verdampfung verloren, andererseits löst sich, wie die Schlackenanalysen (Tabelle 2) zeigen, ein bestimmter Anteil in der flüssigen Schlacke und wird dadurch dem ge-

Tabelle 2.

Art	Fundort	Probe Nr.	Ag	Al	As	Bi
Platten-schlacke	Kelchalm, Niedermosern	1	+	+	Sp	?
	„ , Kelchmoos	1	Sp	+	Sp	—
	„ , „	2	?	+	Sp	?
Derb-schlacke	Wurzhöhe, Scheringer	1	—	+	Sp	?
	„ , „	2	—	+	Sp	—
	„ , „	3	—	+	?	—
	Kupferplatte, Keilhuberalm	1	—	+	Sp	?
	„ , „	2	—	+	Sp	?
	Wirtsalpe, Scheidehalde	1	—	Sp	Sp	—
	(b. Viehhofen) Schlackenplatz	1	Sp	+	Sp	—

schmolzenen Metall entzogen. Das bedeutet aber, daß sich die Konzentrationsverhältnisse der einzelnen Elemente im Fertigobjekt gegenüber denen im Erz in ganz unkontrollierbarer Weise verschieben, denn eine solche unregelmäßige Verteilung zwischen Schlacke und flüssigem Kupfer gilt natürlich auch für die nichtflüchtigen Elemente. Das heißt weiter, daß man zwar (mit Ausnahme von Quecksilber, das bereits bei sehr niederer Temperatur vollständig flüchtig ist) qualitativ alle Spuren und Verunreinigungen des Kupferkieses im Fertigobjekt wiederfindet, aus ihren Konzentrationsverhältnissen aber keinen Schluß auf die Herkunft der verarbeiteten Erze ziehen kann.

Durch die Fahlerzbeimengung können auch die Schwankungen in den Konzentrationen von Kobalt und Nickel bei den Fertigobjekten erklärt werden; diese Elemente kommen wohl auch in den Kupferkiesen vor, in den Fahlerzen treten sie aber in zum Teil höheren Konzentrationen auf.

Weiters zeigt sich, daß die untersuchten Proben, obwohl sie aus einem relativ kleinen Raum stammen, sehr uneinheitlich sind. Wieder ergibt sich hier eine Bestätigung der bekannten Tatsache, daß die Zusammensetzung einer Erzlagerstätte schon über kleine Distanzen stark variieren kann. Man kann beim Vorliegen von nur wenigen Proben keine endgültige Aussage über die Lagerstätte machen.

Auf den speziellen Fall der urgeschichtlichen Problematik übertragen heißt das aber, daß die Zuordnung von Kupferobjekten zu bestimmten Erzlagerstätten infolge der Inhomogenität der Lagerstätten sowie der Veränderung der Konzentrationsverhältnisse beim Aufbereitungsprozeß auf große und fast unlösbare Schwierigkeiten stößt. Die Aussage aber, daß ein Teil der Spurenelemente in den Kupferobjekten des Gebietes Kelchalm aus den mit dem Kupferkies vergesellschafteten Fahlerzen stammt, kann mit großer Wahrscheinlichkeit gemacht werden.

Schlackenanalysen

Ca	Co	Cr	Cu	Fe	Mg	Mn	Ni	Pb	Sb	Si	Sn	Zn
++	Sp	Sp	++	+++	+	+	Sp	+	Sp	++	Sp	Sp
++	+	Sp	++	+++	+	+	Sp	?	Sp	++	Sp	Sp
++	+	Sp	++	+++	+	+	Sp	?	Sp	++	Sp	Sp
++	Sp	?	++	+++	+	+	Sp	—	—	++	Sp	—
++	Sp	?	++	+++	+	+	Sp	—	—	++	Sp	—
++	Sp	—	++	+++	+	+	—	—	—	++	?	—
++	?	?	++	+++	+	Sp	?	—	—	++	?	—
++	Sp	?	++	+++	+	+	?	—	?	++	—	—
+	Sp	+	++	+++	+	Sp	?	—	—	++	—	—
++	Sp	Sp	++	+++	+	Sp	Sp	Sp	—	++	Sp	—

II

Bei Grabungen im Gebiet der Gemeinde Jochberg bei Kitzbühel (Tirol) wurde an einem Weg beim Lehen Schawetz ein urzeitlicher Schmelzplatz aufgedeckt, der neben zwei kleinen Stücken Kupferkies und einem wahrscheinlich mittelbronzezeitlichen Nadelkopf mehrere Schlackenkuchen lieferte, die sich schon äußerlich wesentlich von den bisher bekannten Schlacken unterschieden. Sie waren in Form und Größe brotlaibartig mit unregelmäßiger Oberfläche; besonders auffallend war ihre schwarze Farbe sowie ihr gegenüber den üblichen Schlacken hohes spez. Gewicht. Beim Zerschlagen wiesen sie im Inneren eine sehr poröse Struktur mit unaufgeschlossenen Quarzknöllchen bis zu 4 mm Durchmesser auf. Weiters fanden sich zahlreiche Stellen, die feine goldgelbe Erzflitterchen eingeschlossen hielten.

Die Untersuchung sollte nun ergeben, ob diese Schlacke ein Rückstand aus einer Kupferaufbereitungsschmelze oder eine aus irgendeinem Grund mißglückte Schmelze (sogenannte „Ofensau") sein könnte.

Die Objekte wurden zunächst spektrographisch untersucht. Die Analysenergebnisse waren folgende:

	Ag	Al	As	Bi	Ca	Co	Cr	Cu	Fe
Nadelkopf .	+	+	Sp	?	—	Sp	—	+++	+
Kupferkies .	Sp	Sp	Sp	—	+	+	—	+++	+++
Schlacke . . .	?	+	?	—	+	Sp	Sp	+	+++

	Hg	Mg	Mn	Ni	Pb	Sb	Si	Sn	Zn
Nadelkopf .	—	—	—	+	?	Sp	—	—	—
Kupferkies .	Sp	++	Sp	Sp	Sp	—	+++	Sp	—
Schlacke . . .	—	+	+	Sp	Sp	—	+++	Sp	—

Das Erz sowie der Nadelkopf fügen sich den bisherigen Ergebnissen gut ein, die Schlacke aber fällt durch ihren niederen Kupfergehalt auf. Um genaue Werte über die quantitative Zusammensetzung der Hauptbestandteile zu erhalten, wurden diese auf naßchemischem Wege bestimmt. Ebenso wurde das Erz zu Vergleichszwecken analysiert. Die Ergebnisse dieser Analysen lauten:

	Schlacke	Erz
SiO_2	31,2%	17,6%
Cu	0,25%	21,9%
Fe	46,5%	30,7%
S	9,4%	28,2%

Der Kupfergehalt dieser Schlacke ist erheblich niederer als bei den bisher untersuchten Schlacken (Tabelle 2), deren Gehalt an Kupfer (aus visuellen Schätzungen der Spektrogramme) mindestens eine Zehnerpotenz höher liegt. Dies spricht bereits dagegen, daß die Schlacke ein Rückstand aus einem Kupferaufbereitungsprozeß sein kann. Zum Vergleich sei angeführt, daß die Kupferhütten heute eine Schlacke mit etwa 0,3% Kupfer bei der Rohsteinschmelze als absetzbar ansehen, während die bei der Konzentrationssteinschmelze anfallende Schlacke mit 1 bis 2% Kupfer neuerlich zur Rohsteinschmelze eingesetzt wird[2]. Es ist nicht anzunehmen, daß der Stand der urzeitlichen Kupferaufbereitung ein so hoher war, daß sie die Schlackenreinheit moderner Verfahren mit ihren exakt bestimmten Zuschlagsmengen erreichte.

Der hohe Schwefelgehalt gibt zusammen mit der sehr großen Porosität einen Hinweis auf die infolge zu niederer Temperatur (schlechte Ofenkonstruktion) unvollständig abgelaufene Reaktion. Dabei wurde die Schmelze nicht richtig flüssig, so daß sie Gasblasen einschloß und nichtumgesetztes Erz und Zuschläge zurückblieben. Das Erz ist in Form der gelben Flitter noch in der Schlacke sichtbar. Auch die unaufgeschmolzenen Quarzbröckchen weisen auf eine zu niedere Ofentemperatur hin.

Wird der Schwefelanteil der Schlacke auf Pyrit umgerechnet, kommt man auf 17,5% FeS_2. Der verbleibende Rest von 38,3% Eisen ergibt umgerechnet 49,35% FeO. Damit erhält man als Summe von FeS_2, FeO und SiO_2 98,3%. Die restlichen 1,7% verteilen sich auf Spuren und Verunreinigungen (Analoges gilt auch für den Kupferkies).

Für das Vorliegen des restlichen Eisens als Oxyd spricht die leichte Reduzierbarkeit zu metallischem Eisen. So wurden beim Schmelzen von 0,1163 g Schlacke (vermischt mit Kohlepulver im Verhältnis 1 : 1) im elektrischen Lichtbogen in einem kleinen Graphittiegel 0,0483 g Eisen erhalten, das entspricht 41,5% der Einwaage. Dieser Wert zeigt relativ gute Übereinstimmung mit dem analysierten Wert von 46,5% Eisen.

Der Kupfergehalt von 0,25% liegt in der üblichen Größe der Verunreinigungen im Pyrit.

Der Kieselsäureanteil der Schlacke liegt sehr hoch. Dies weist im Zusammenhang mit dem niederen Calciumgehalt darauf hin, daß die Zuschläge falsch gewählt wurden und so die ganze Schmelzung zum Scheitern verurteilt war.

Die Schlacke scheint also ein Rückstand aus mißglückten frühen Schmelzversuchen urzeitlicher Prospektoren zu sein, wobei diese auf Grund der äußerlichen Ähnlichkeit offenbar den bei Jochberg vorkommenden Pyrit mit dem ihnen bekannten Kupferkies verwechselten. Da weiters der für die Schmelze notwendige Kalk in dieser Gegend sehr selten ist (das nächste Kalkvorkommen liegt im Kaisergebirge, etwa 20 km nördlich), wurde möglicherweise wieder auf Grund einer Verwechslung der Quarzzuschlag zu hoch gewählt. Diese Faktoren führten zusammen mit der für die Schmelzung zu niederen Temperatur zu dem vorliegenden mißglückten Schmelzprodukt, das wir damit als ein Relikt aus jener Zeit ansehen können, da der Mensch die ersten Versuche zur Metallgewinnung begann. Der vorgefundene Kupferkies sowie der Nadelkopf stehen scheinbar in keinem direkten Zusammenhang mit der Schlacke und stammen möglicherweise von späteren Schmelzungen.

Zusammenfassung

Es wird über neue Ergebnisse von Untersuchungen zum Problem des urzeitlichen Kupferbergbaues berichtet. Im Falle der Lagerstätte Kelchalm (Tirol) konnte spektralanalytisch eine Vergesellschaftung von Kupferkies mit Fahlerz nachgewiesen werden und durch die wahrscheinliche Mitverarbeitung dieses Erzes beim urzeitlichen Schmelzprozeß eine Erklärung für das verstärkte Auftreten von Antimon, Arsen und Wismut in den Fertigobjekten gegeben werden. Der Zuordnung dieser Objekte zu dem Erz einer bestimmten Lagerstätte stehen jedoch auf Grund der Verluste beim Aufbereitungsprozeß sehr große Hindernisse entgegen.

Weiters konnte eine Schlacke als Rückstand aus einem mißglückten Schmelzversuch identifiziert werden, wobei bei der Aufbereitung der Kupferkies mit Pyrit verwechselt worden sein dürfte.

Summary

New results are recorded of studies of the problem of prehistoric copper mining. In the case of the Kelchalm deposit (Tyrol) an association was shown of chalcopyrite and tetrahedrite, and through the probable concomitant working of this ore in the prehistoric smelting process an explanation is given for the reinforced occurrence of antimony, arsenic, and bismuth in the finished objects. The ascription of these objects to the ore of a particular deposit however is made very difficult by reason of the losses during the dressing process.

In addition, a slag might be identified as the residue of a smelting process that failed in which in the preparation of the ore pyrite might have been mistaken for chalcopyrite.

Résumé

Compte rendu de nouveaux résultats de recherches relatives au problème de l'exploitation des mines de cuivre dans les temps primitifs. Dans le cas du gisement de Kelchalm (Tyrol) il a été possible d'identifier une association de chalcopyrite et de cuivre gris; le traitement vraisemblable de ce minerai mixte par fusion, suivant la technique des temps primitifs, permet de rendre compte des teneurs élevées en antimoine, arsenic et bismuth des objets ouvrés. Toutefois, l'établissement d'une correspondance entre ces objets et le minerai d'un gisement déterminé rencontre de très grandes difficultés du fait des pertes résultant des traitements préalables mis en œuvre.

Il a été en outre possible de déterminer qu'une scorie n'était autre que le résultat d'un essai de fusion malheureux dans lequel il a dû se produire une inversion entre les traitements préalables de la pyrite et du cuivre gris.

Literatur

[1] *J. Derkosch, F. X. Mayer* † und *H. Neuninger*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 1649.

[2] *K. Winnacker* und *E. Weingaertner*, Chemische Technologie, Bd. 5. München: C. Hanser. 1953.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University, Osaka, Japan

New Applications of Addition-Standard Technique in Flame Spectrophotometry*

By

Shouzow Fukushima, Kizashi Takahashi, Satoshi Terasaka, and Kiyoteru Otozai

With 2 Figures

(Received November 24, 1956)

Introduction

In flame spectrophotometry, extensive efforts of research workers have been devoted to finding better methods of avoiding errors caused by the "interference of concomitants". Most of these methods depend upon the equality in magnitude or extent of interferences in the standard and in the sample given.

Some workers have achieved this end by using standards of the same composition as the samples. Applications of such procedures may be limited to cases where a quantitative knowledge of the sample composition and pure reagents neccessary for synthesis of standards can be provided.

Some other workers have made use of standards which are not necessarily of the same composition but include some limited kinds of concomitants substantially responsible for the interference, because it is known that certain kinds of substances are really inert in their effect on the emission intensities of some specified substances. Moreover, in some cases the concentration of an interfering concomitant need not be exactly the same in standard and in samples, because of the invariance of the interfering effect; namely, magnitude of interference in the determination of the element remains constant and invariable in a certain range of concentration of an interfering concomitant, and therefore, a variation of the concentration of such an interfering concomitant within a certain range produces no difference in the emission intensities of the

* For definitions and terminology, see reference [4].

specified substance. By these modifications of "the equal composition principle", requirements for previous knowledge about sample composition, or time to prepare standards, are substantially lessened, but the practical procedures are still extensive and tedious where the variety of samples is large.

In these respects the addition-standard technique is more favourable, because "a basic sample solution" and "the standard-added solution" can be made to have the same concomitants without any knowledge about the sample composition. However, in this technique the absolute value of the concentration of a specified substance cannot be indicated in the "standard solution", but only the difference of the concentrations of the specified substance between "basic" and "standard-added" solutions. Therefore, some special device must be used in order to find the absolute concentration from the measurements of emission intensities.

Among these methods "the logarithmic line method" and "the linear extrapolation method" have been already used[1–3]. The former is based on the experimental fact that $\log C$ (C denotes the concentration of the specified substance in the sprayed solution) and $\log I$ (I denotes emission intensities of a specified element measured with a certain set of instrumental conditions) in many cases have a linear relation to each other even with or without an interfering concomitant. But, unfortunately, it is known that $\log C - \log I$ relations are not linear in the cases of Li, Na and K, and the "logarithmic line method" may give erroneous results if applied to these alkali metals.

The linear extrapolation method is applicable only when C and I (not logarithms but C, I, themselves in this case) are in linear relation. Here again most alkali metals Li, Na, K, etc. do not conform except in the very dilute concentration range.

The new methods here proposed, included in addition-standard technique, are named the "concentration-coefficient method" and the "intensity-coefficient method" respectively, and it is their characteristic feature that they do not presuppose any special functional form of C–I relation (in other words whether $\log C - \log I$ or C–I curve is linear or curved) but depend upon certain types of interference. Therefore, these methods are applicable to any element but the nature of concomitants may be limited depending upon the type of interference caused.

Principles of New Methods

1. General Remarks on Interferences

From a phenomenalistic point of view, various interferences of concomitants can be classified in two categories, giving "additive interference" or "multiplicative interference"[4].

Additive interference may be rather readily detected and removed, because the additively interfering radiation, in many cases, has more or less a continuous character. If the radiation of the specified substance has "line characteristic", as when an alkali element is specified, intensity observation at neighbouring wavelengths can indicate an adequate value which is regarded as the intensity of the radiation from the concomitant at the wavelength of the line of the specified element.

2. *General Form of Multiplicative Interference*[4]

It has been found that many multiplicative interferences can be generalized by a "rule of log-log translation". And such a multiplicative interference can be characterized by a set of two constants m and n, and mathematically "concomitant" C–I curves can be expressed as

$$I = f^*_{(C)} = n \cdot f_{(m \,.\, C)}, \tag{1}$$

if $I = f_{(C)}$ and $I = f^*_{(C)}$ are the functional expressions of the "specified" and "concomitant" C–I curves, respectively.

Sets of constants m and n, which are named "*concentration coefficient*", and "*intensity coefficient*" *of an interference*, respectively, must be dependent upon the nature and quantities of the concomitants and also upon the instrumental conditions, mainly the flame characteristics.

It must be emphasized, here, that a set of m and n can be determined to some extent by an arbitrary choice. It should be kept in mind that constants m and n have a geometrical meaning in that the "specified" $\log C - \log I$ curve can be superimposed on any "concomitant" $\log C - \log I$ curve when the "specified" curve is translated by $\log 1/m$ in the direction parallel to $\log C$ axis and by $\log n$ in the direction parallel to $\log I$ axis. Hence, in a certain case, even if by a certain translation characterized by one set of m and n, both other than 1.0, a "specified" $\log C - \log I$ curve may be superimposed on a "concomitant" $\log C - \log I$ curve, it does not exclude the possibility that the superimposition would be achieved also by a translation characterized by another set of m and n, one of those constants being equal to 1.0. It is obvious that $m = 1.0$, and $n = 1.0$ mean purely vertical and purely horizontal translation, respectively, of the "specified" $\log C - \log I$ curve.

3. *Principle of Concentration-Coefficient Method*

Sometimes the interference of a concomitant under a given condition can be approximately expressed by giving an appropriate value to the concentration coefficient, m, even if the intensity coefficient, n, is set at 1.0. In other words, the "concomitant" C–I curve, $I = f^*_{(C)}$ can be expressed in a form

$$I = f^*_{(C)} = f_{(m \,.\, C)}. \tag{2}$$

Here, $I = f_{(C)}$, the "specified" C–I function can readily be obtained by synthesis of a series of "specified standards" (pure solutions of a specified substance) and measurement with them. But for an unknown sample, the value of m the function $I = f^*_{(C)}$ or the concentration C, are not known. However, $I_{(x)} = f^*_{(x)}$ (unknown C is put as x) is measurable when the "basic" sample solution is sprayed into flame. Similarly, $I_{(x+\Delta)} = f^*_{(x+\Delta)}$ can be measured with "standard-added solution" in which the concentration of the specified substance is $x + \Delta$ (Δ is known added standard) and that of concomitants is kept the same as the "basic sample solution". In this case, such concentrations of specified substance x' and Δ' defined by the relations

$$I_{(x)} = f^*_{(x)} = f_{(x')} \tag{3}$$

and

$$I_{(x+\Delta)} = f^*_{(x+\Delta)} = f_{(x'+\Delta')} \tag{4}$$

can be obtained by referring to the "specified" C–I curve. Then it should be noted from eq. (2), (3) and (4) that we have the relations

$$f^*_{(x)} = f_{(x')} = f_{(m \cdot x)}$$

and

$$f^*_{(x+\Delta)} = f_{(x'+\Delta')} = f_{(m\overline{x+\Delta})}$$

therefore

$$x' = m\,x, \tag{5}$$

$$x' + \Delta' = m\,(x + \Delta). \tag{6}$$

From eq. (5) and (6) we can get the unknown x as

$$x = \frac{1}{m} \cdot x' = \frac{\Delta}{\Delta'} \cdot x'. \tag{7}$$

As this principle of determining x is based upon a substitution of an unknown concentration coefficient m by $\frac{\Delta'}{\Delta}$, the method is named the "concentration-coefficient method".

4. Principle of Intensity-Coefficient Method

In some cases the interferences of concomitants under given conditions can be expressed with good approximation by giving an appropriate value to the intensity coefficient n, even if the concentration coefficient m is set at 1.0. In other words, the "concomitant" C–I curve $I = f^*_{(C)}$ can be expressed in a form

$$I = f^*_{(C)} = n \cdot f_{(C)}. \tag{8}$$

When a ratio r_Δ is defined as $r_{\Delta(C)} = I_{(C+\Delta)}/I_{(C)}$, the ratio of the intensity of "standard-added solution" to that of "basic sample solution", then it follows from eq. (8) that

$$r_{\Delta(C)} = \frac{I_{(C+\Delta)}}{I_{(C)}} = \frac{f^*_{(C+\Delta)}}{f^*_{(C)}} = \frac{n \cdot f_{(C+\Delta)}}{n \cdot f_{(C)}} = \frac{f_{(C+\Delta)}}{f_{(C)}}. \tag{9}$$

It is important to note that n has disappeared from the last part of eq. (9), because it means that $r_{\Delta(C)} = \frac{f^*_{(C+\Delta)}}{f^*_{(C)}}$; in other words a function of the "concomitant" sample is equal to the analogous function of the "specified" standard, $\frac{f_{(C+\Delta)}}{f_{(C)}}$.

Therefore, when the magnitude of Δ is once determined, r_Δ for every value of C can be estimated from the "specified" C–I curve $I = f_{(C)}$, and $r_{\Delta(x)}$ is only dependent upon x whether the interfering concomitant is contained in a sample solution or not.

Hence, when r_Δ calculated from "specified" C–I curve is plotted against C, a hyperbola-like curve may be obtained. For a unknown sample, $I_{(x)} = f^*_{(x)}$ and $I_{(x+\Delta)} = f^*_{(x+\Delta)}$ are to be measured and $r_{\Delta(x)} = \frac{I_{(x+\Delta)}}{I_{(x)}}$ may be calculated by appropriate procedures including the addition-standard technique. By referring to the curve obtained above, a concentration x would be found which fulfil the condition $r_{\Delta(x)} = \frac{f_{(x+\Delta)}}{f_{(x)}}$.

As this principle of determination is based upon a cancellation of the unknown intensity coefficient n, the method is named "intensity-coefficient method".

Demonstrating Experiments

1. General

The concentration-coefficient method is demonstrated for a case where NaCl is the specified substance and 5% sucrose is the concomitant (Experiment I). This case was reported in preceding paper[4] to have $m = 1.19$ and $n = 0.983$, but because of the arbitrariness of m- and n-choice, as already mentioned, n can equally be assumed to be 1.0.

The intensity-coefficient method is demonstrated for a case where NaCl is the specified substance and 0.5% KCl is the concomitant (Experiment II). This case was already proved in preceding paper to have $m = 1.00$, and $n = 1.21$.

NaCl, KCl and sucrose used for sample preparation were "Special Grade" of "Japan Industrial Standard" and KCl and sucrose were found to contain Na only in a negligible amount.

Measurements were made by the use of Beckman DU quartz spectrophotometer with 9200 flame attachment and 4030 acetylene-oxygen burner. Various conditions and settings used are shown in Table I.

Table I. Instrumental Conditions and Settings

Gas Pressures:			
Oxygen	20.0 p. s. i.	13.0 p. s. i.	
Acetylene	3.5 p. s. i.	Exp. I*	3.0 p. s. i. Exp. II*
Needle Valve:	Opened about 70° from closed limit		
Wavelength:	589 mμ		
Slit Width:	0.04 mm		
Phototube:	Blue sensitive one		
Phototube Loadregister:	10^{10} ohms		
Selector Switch:	.1 position		
Sensitivity Knob:	Clockwise limit		

* A different burner was used for each experiment and pressures were chosen for a specific burner to give maximum precision of repeated measurement.

2. Demonstration of Concentration-Coefficient Method (Experiment I)

In the first place, a series of pure NaCl solutions was prepared and a "specified" *C–I* curve was constructed as in Fig. 1, by the use of the results shown in Table II.

Table II. *C–I* Values Measured With "Specified" NaCl Standards (Exp. I)

C, meq./l	I
0.00	0.00
0.871	38.2
1.74	60.2
2.61	76.6
3.48	89.4
4.35	100.0
5.23	108.8
6.09	117.1
6.96	124.5
7.84	131.0

Six sample solutions (No. 1–6) were prepared so that each one contained various concentrations of NaCl as the specified substance and 5% sucrose as a concomitant. Each concentration of NaCl (x meq./l) was exactly known but was treated as "unknown".

Let us explain how to find the unknown concentration x by the concentration-coefficient method, taking sample No. 3 as an example. Fig. 1 and Table III may help in following the explanation.

When the "basic sample solution" is sprayed into the flame, $I_{(x)}$ is found to be 81.8, from which an "apparent concentration" x' may be found to be 2.95 meq./l. Setting Δ at 1.74 meq. l (this value of Δ is rather arbitrarily chosen, see Discussion), a "standard-added solution" was prepared to contain $(x + \Delta)$ meq. l NaCl and the same concentration of sucrose as the "basic sample solution". A measurement of the "standard-added solution" shows $I_{(x+\Delta)} = 105.5$ and then $x' + \Delta' = 4.88$ meq./l, so that, an "apparent concentration of added standard", Δ' is $4.88 - 2.95 = 1.93$ meq./l.

Finally the unknown x is calculated by eq. (7) and $x = 2.95 \times 1.74/1.93 = 2.66$ meq./l is to be found. As the real x is 2.61 meq./l, the error should be $+0.05$ meq./l or relatively 1.9% of x.

All these procedures were caried out for all the samples and the results are given in Table III.

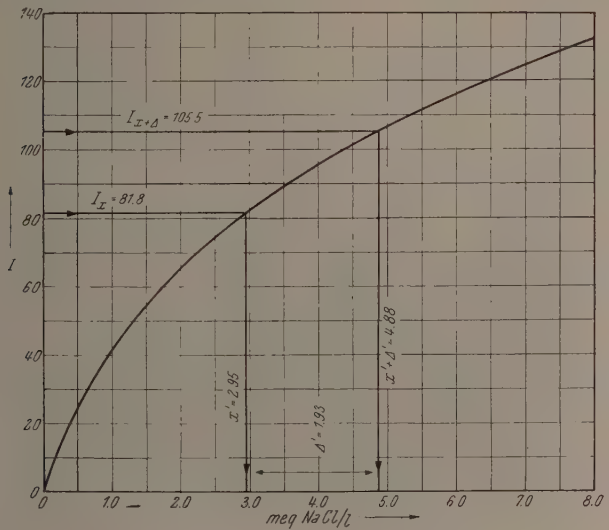


Fig. 1. Specified C—I Curve for Experiment I, and Illustration of Concentration-Coefficient Method (Sample No. 3)

Table III. Results of Concentration-Coefficient Method

No.	x hidden meq./l	$I_{(x)}$ measured	x' (apparent x)	$I_{(x+\Delta)}$ measured*	Δ' (apparent Δ)*	x found $\left(= \frac{\Delta}{\Delta'} \cdot x'\right)$	error	% error
1	0.871	41.8	0.992	81.8	1.95	0.885	+ 0.014	1.6
2	1.74	64.2	1.93	95.1	2.00	1.68	— 0.06	3.4
3	2.61	81.8	2.95	105.5	1.93	2.66	+ 0.05	1.9
4	3.48	95.1	3.93	115.0	1.93	3.54	+ 0.06	1.7
5	4.35	105.5	4.87	123.6	1.97	4.30	— 0.05	1.2
6	5.23	115.0	5.86	131.0	1.97	5.18	— 0.05	1.0
							Average...	1.8

* Real Δ is 1.74 meq./l.

3. Demonstration of Intensity-Coefficient Method

As a first step, Δ, the concentration of added standard must be determined (see Discussion). For the illustration two different Δ are used, which will be designated by Δ_1 and Δ_2.

The values of these are, $\Delta_1 = 2.18$ meq./l and $\Delta_2 = 3.48$ meq./l.

For the construction of a C–r_{Δ} curve, measurements on two series of "specified" NaCl standard solutions are necessary, i. e., C-series and $(C + \Delta)$-series which give $I_{(C)}$-values and $I_{(C+\Delta)}$-values, respectively.

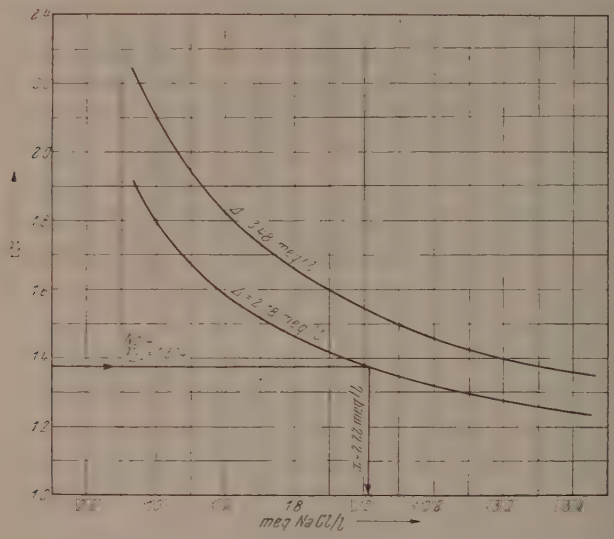


Fig. 2. C—r_{Δ} Curve for Experiment II, Working Curve for Intensity-Coefficient Method (For "r_{Δ}" read "r_{Δ}" and for "r_{Δ_1}" read "r_{Δ_1}")

Table IV. Measurement of $I_{(C)}$ and $I_{(C+\Delta)}$ and Calculation of r_{Δ} With "specified" NaCl Solution

C meq./l	$I_{(C)}$	Δ = 2.18 meq./l		Δ = 3.48 meq./l	
		$I_{(C+\Delta)}$	$I_{(C+\Delta)}/I_{(C)}$ r_{Δ_1}	$I_{(C+\Delta)}$	$I_{(C+\Delta)}/I_{(C)}$ r_{Δ_2}
0.87	44.8	85.3	1.904	100.0	2.232
1.09	50.6	87.9	1.737	102.2	2.020
1.31	55.8	90.4	1.620	104.3	1.869
1.52	60.3	92.9	1.541	106.3	1.763
1.74	64.4	95.3	1.480	108.3	1.682
1.96	68.4	97.7	1.428	110.1	1.610
2.18	72.2	100.0	1.385	112.0	1.551
2.39	75.8	102.2	1.348	113.7	1.500
2.61	79.3	104.3	1.315	115.4	1.455
2.83	82.4	106.3	1.290	117.1	1.421
3.05	85.3	108.3	1.270	118.9	1.394
3.26	87.9	110.1	1.252	120.6	1.372
3.48	90.4	112.0	1.239	122.2	1.352

These solutions were prepared and measurements of the "specified" NaCl standard solutions were made for Δ_1 and Δ_2, and the r_{Δ_1} and r_{Δ_2} were calculated*. The results are shown in Table IV, with which C–r_Δ curves were constructed as shown in Fig. 2.

In this experiment seven sample solutions (No. 1–7) were prepared so that each one contained various concentrations of NaCl as the specified substance and 0.5% KCl as a concomitant. Each concentration of NaCl (x meq./l) was exactly known but was again treated as an "unknown".

The procedure to find the unknown concentration x according to the intensity-coefficient method are explained with sample No. 4 as an example.

$I_{(x)}$ and $I_{(x+\Delta)}$ are measured, with the "basic sample solution" and the "standard-added solution", respectively.

When $\Delta = 2.18$ meq./l, we get $I_{(x)} = 81.7$ and $I_{(x+\Delta)} = 112.3$ then $r_{\Delta(x)} = 112.3/81.7 = 1.374$ may be estimated. Reference to a C–r_{Δ_1} curve of Fig. 2 shows that this value of r_Δ corresponds to $C = 2.22$ meq./l, which is x found. As the real x is 2.18 meq./l, the error should be $+0.04$ meq./l or relatively 1.8% of x.

* Comparing with data in Exp. I and II, I-values for corresponding C are somewhat different. This is because a different burner was used for each experiment. This fact indicates the dependence of the $I = f_{(C)}$ function upon burner structure or burning conditions (see Table I).

Table V. Results of Intensity-Coefficient Method

No.	x hidden meq./l	$I_{(x)}$ measured	$\Delta = 2.18$ meq./l $= \Delta_1$					$\Delta = 3.48$ meq./l $= \Delta_2$				
			$I_{(x+\Delta)}$ measured	r_{Δ_1} estimated	x found meq./l	error meq./l	error %	$I_{(x+\Delta)}$ measured	r_{Δ_2} estimated	x found meq./l	error meq./l	error %
1	0.87	50.2	94.6	1.884	0.895	+ 0.025	2.9	112.3	2.237	0.865	— 0.005	0.6
2	1.31	63.2	101.3	1.603	1.35	+ 0.04	3.1	117.1	1.853	1.33	+ 0.02	1.5
3	1.74	73.4	106.9	1.456	1.83	+ 0.09	5.2	121.4	1.654	1.82	+ 0.08	4.6
4	2.18	81.7	112.3	1.374	2.22	+ 0.04	1.8	125.5	1.536	2.22	+ 0.04	1.8
5	2.61	88.5	117.1	1.323	2.56	— 0.05	1.9	129.4	1.462	2.59	— 0.02	0.8
6	3.05	94.6	121.4	1.283	2.91	— 0.14	4.6	133.2	1.408	2.93	— 0.12	3.9
7	3.48	101.3	125.5	1.239	3.48	± 0.00	0.0	136.7	1.349	3.50	+ 0.02	0.6
					Average...		2.8			Average...		2.0

The same procedures were carried out for all sample solutions and also with another Δ, i. e., $\Delta_2 = 3.48$ meq./l. All the results are shown in Table V.

Discussion

1. Choice of Optimum Δ Value

Both the concentration-coefficient and intensity-coefficient methods here proposed include indirect estimations of the concentrations. As a result, errors in quantities measured directly may extend into the final results in a complex manner which is dependent upon the magnitude of Δ added.

So, for a given sample the magnitude of Δ should be very carefully determined in order to obtain an accurate result. Unfortunately, a theoretical analysis of the error propagation, especially its dependence upon Δ has not yet been accomplished and no guiding principle of choice of Δ can yet be presented. However, it is suggested from our experience that Δ should be comparatively larger than x.

2. Possible Modification of the Methods

It was stated that the concentration-coefficient method can be applied only to the case where intensity coefficient can be set at 1.0 and the intensity-coefficient method can be applied only to the case where the concentration coefficient can be set 1.0. These coefficients m and n are defined by reference to the "concomitant" C–I function $I = f^*_{(C)}$ and to the "specified" C–I function $I = f_{(C)}$. In other words $f^*_{(C)}$ is expressed in terms of $f_{(C)}$ as

$$f^*_{(C)} = n \cdot f_{(m \cdot C)}.$$

But a "concomitant" C–I function $I = f_1{}^*_{(C)}$ would possibly be expressed in terms of another "concomitant" C–I function $I = f_2{}^*_{(C)}$.

Suppose $f_1{}^*_{(C)} = n_1 \cdot f_{(m_1 \cdot C)}$ and $f_2{}^*_{(C)} = n_2 \cdot f_{(m_2 \cdot C)}$, then it can be proved that

$$f_1{}^*_{(C)} = \frac{n_1}{n_2} \cdot f_2{}^* \left(\frac{m_1}{m_2} \cdot C \right).$$

When "apparent" concentration and intensity coefficients are designated M and N, and put $M_1 = \frac{m_1}{m_2}$ and $N_1 = \frac{n_1}{n_2}$, the former "concomitant" C–I function $f_1{}^*_{(C)}$ can be expressed in an analogous form, the "specified" C–I function $f_{(C)}$ being substituted by the latter "concomitant" C–I function $f_2{}^*_{(C)}$, i. e.,

$$f_1{}^*_{(C)} = N_1 \cdot f_2{}^* (M_1 \cdot C).$$

Then, even if neither m nor n is 1.0, N_1 or M_1 can be set to be 1.0, when an adequate "concomitant" C–I function can be found as a reference C–I function, and a modified concentration-coefficient method or a modified intensity-coefficient method may be applied.

Summary

1. To avoid errors caused by a multiplicative interference of the concomitants, the addition standard techniques are excellent, because no knowledge about the sample composition is presupposed.

2. The "concentration-coefficient method" is applicable where the "concomitant" C–I function $I = f^*_{(C)}$ can be expressed as $f^*_{(C)} = f_{(m \cdot C)}$ where $I = f_{(C)}$ is the "specified" C–I function and m is a constant. In this method, an apparent concentration x' of the "basic sample solution" and an apparent concentration of added standard Δ' are obtained by the use of the "specified" C–I curve, and the real concentration of the "basic sample solution" x is found to be $x = \frac{\Delta}{\Delta'} \cdot x'$, where Δ is the real concentration of added standard.

3. The "intensity-coefficient method" is applicable where the "concomitant" C–I function can be expressed as $f^*_{(C)} = n \cdot f_{(C)}$, where n is a constant. Intensities $I_{(C)}$ of the "specified" standard solution and $I_{(C+\Delta)}$ of the "specified" standard-added solution are measured and a ratio $r_{\Delta\,(C)} = \frac{I_{(C+\Delta)}}{I_{(C)}}$ is plotted against C. The resulting hyperbola-like curve now acts as a working curve for the determination.

For a given sample, $I_{(x)}$, the intensity of a "basic sample solution" and $I_{(x+\Delta)}$, that of the "standard-added sample solution" are measured and a ratio $r_{\Delta\,(x)} = \frac{I_{(x+\Delta)}}{I_{(x)}}$ is now referred to the C–r_Δ working curve so that x may be found.

4. Illustrative examples are shown using the Beckman DU flame spectrophotometer with an acetylene-oxygen burner.

The concentration-coefficient method was applied to six samples containing 0.87–5.2 meq./l NaCl as specified substance and 5% sucrose as an interfering concomitant. The average error was 1.8% of the concentrations sought.

The intensity-coefficient method was applied to seven samples containing 0.87–3.5 meq./l NaCl as a specified substance and 0.5% KCl as an interfering concomitant. The average error was 2.0–2.8% of the concentrations sought.

5. Possible modifications of the two methods are suggested in order to extend the application of the methods.

Zusammenfassung

1. Zur Vermeidung von Fehlresultaten durch multiplikative Störung seitens der Begleitstoffe eignet sich die Zugabe von Standardsubstanzen, da dieses Verfahren keinerlei Kenntnis über die Zusammensetzung der Probe erfordert.

2. Die „Konzentrations-Koeffizient"-Methode ist geeignet, wenn die Konzentrations-Intensitäts-(C–I)-Funktion [$I = f^*_{(C)}$] der Begleitsubstanz mit der Gleichung $f^*_{(C)} = f_{(m \cdot C)}$ ausgedrückt werden kann, worin $I = f_{(C)}$

die C–I-Funktion der zu bestimmenden Substanz und m eine Konstante ist. Bei diesem Verfahren erhält man durch Anwendung der C–I-Kurve der zu bestimmenden Substanz eine scheinbare Konzentration (x') der Grundlösung und eine scheinbare Konzentration (Δ') des zugesetzten Standards. Die tatsächliche Konzentration der Grundlösung x ergibt sich dann aus $x = \frac{\Delta}{\Delta'} \cdot x'$, worin Δ die tatsächliche Konzentration des zugesetzten Standards bedeutet.

3. Die „Intensitäts Koeffizient"-Methode ist geeignet, wenn die C–I-Funktion der Begleitsubstanz durch die Gleichung $f^*_{(C)} = n \cdot f_{(C)}$ ausgedrückt werden kann, worin n eine Konstante ist. Die Intensität $I_{(C)}$ der betreffenden Standardlösung und $I_{(C+\Delta)}$ der betreffenden, mit einem Standard versehenen Probelösung werden gemessen und das Verhältnis $r_{\Delta(C)} = \frac{I_{(C+\Delta)}}{I_{(C)}}$ gegen C aufgetragen. Die sich ergebende hyperbolische Kurve dient als Grundlage für die Bestimmung. Für eine gegebene Probe mißt man $I_{(x)}$, die Intensität einer Grundlösung, und $I_{(x+\Delta)}$, die Intensität einer mit Standardsubstanz versehenen Probelösung und ermittelt aus dem Verhältnis $r_{\Delta(x)} = \frac{I_{(x+\Delta)}}{I_{(x)}}$ und der C–r_Δ-Kurve den Wert für x.

4. Beispiele werden angeführt, wobei ein Beckman-DU-Flammenspektrophotometer mit einer Acetylen-Sauerstoff-Flamme verwendet wurde.

Die „Konzentrations-Koeffizient"-Methode wurde bei sechs Proben angewendet, die 0,87 bis 5,2 Millival NaCl/l als zu bestimmende Substanz und 5% Rohrzucker als störende Begleitsubstanz enthielten. Der durchschnittliche Fehler betrug 1,8% der gesuchten Konzentration.

Die „Intensitäts-Koeffizient"-Methode wurde bei sieben Proben angewendet, die 0,87 bis 3,5 Millival NaCl/l als zu bestimmende Substanz und 0,5% KCl als störende Begleitsubstanz enthielten. Der durchschnittliche Fehler betrug 2,0 bis 2,8% der gesuchten Konzentration.

5. Modifikationen der beiden Methoden werden zwecks Erweiterung ihrer Anwendungsmöglichkeit empfohlen.

Résumé

1° Pour éviter les erreurs dûes à l'effet perturbateur multiplicatif des composants concomitants, les techniques comportant l'addition d'une solution type sont excellentes car elles n'exigent aucune connaissance préalable de la composition de l'échantillon.

2° La méthode du «coefficient de concentration» est applicable lorsque la fonction C—I qui s'écrit $I = f^*_{(C)}$ en présence d'un composant concomitant peut être exprimée sous la forme $f^*_{(C)} = f_{(m.C)}$ telle que $I = f_{(C)}$ soit la fonction C—I normale. Dans cette méthode la courbe normale C—I permet de déterminer les concentrations apparentes x' et Δ' de la solution étudiée et de la solution type ajoutée; la concentration cherchée x se calcule alors d'après la formule $x = \frac{\Delta}{\Delta'} x'$ dans laquelle Δ est la concentration réelle de la solution type.

3° La méthode du «coefficient d'intensité» est applicable lorsque la fonction C—I en présence d'un constituant concomitant peut être exprimée sous la forme $f^*_{(C)} = n \cdot f_{(C)}$ dans laquelle n est une constante. On mesure les intensités $I_{(C)}$ de la solution type normale et $I_{(C+\Delta)}$ de la solution type avec addition connue ce qui permet de tracer la courbe de variation du rapport

$r_{\Delta(C)} = \frac{I_{(C+\Delta)}}{I_{(C)}}$ en fonction de C; on obtient ainsi une courbe d'étalonnage d'allure hyperbolique.

Pour un échantillon donné, on mesure les intensités I_x et $I_{(x+\Delta)}$ de la solution de cet échantillon et de cette solution avec addition connue ce qui permet de calculer le rapport $r_{\Delta(x)} = \frac{I_{(x+\Delta)}}{I_{(x)}}$ et de déterminer ensuite x en reportant $r_{\Delta(x)}$ sur la courbe d'étalonnage $C—r_{\Delta}$.

4⁰ Les auteurs fournissent des exemples illustrant leur travail en faisant usage d'un spectrophotomètre à flamme Beckman DU à brûleur oxyacétylénique. La méthode du «coefficient de concentration» a été appliquée à 6 échantillons contenant de 0,87 à 5,2 milliéquivalents par litre de chlorure de sodium comme substance normale et 5% de sucrose comme substance concomitante à effet perturbateur. L'erreur moyenne égalait 1,8% des concentrations cherchées.

La méthode du «coefficient d'intensité» a été appliquée à 7 échantillons contenant de 0,87 à 3,5 milliéquivalents par litre de chlorure de sodium comme substance normale et 0,5% de chlorure de potassium comme substance concomitante à effet perturbateur. L'erreur moyenne égalait 2,0 à 2,8% des concentrations cherchées.

5⁰ Les auteurs suggèrent des modifications possibles des deux méthodes permettant d'étendre leurs champs d'application.

Literature

[1] *O. S. Duffendack* and *R. A. Wolfe*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **10**, 161 (1930).

[2] *H. Eichoff* und *E. Mainka*, Mikrochim. Acta [Wien] **1955**, 298.

[3] *N. W. H. Addink*, Mikrochim. Acta [Wien] **1955**, 703.

[4] *S. Fukushima*, *M. Shigemoto*, *I. Kato* and *K. Otozai*, Mikrochim. Acta [Wien] **1957**, 34.

Aus dem Chemischen Forschungslaboratorium der Firma Dr. Willmar Schwabe G. m. b. H., Karlsruhe/Baden

Der Nachweis von Flavonen und ihrer Abbauprodukte mit stabilen Diazoniumsalzen durch Tüpfelreaktionen

Von

Richard Neu

(Eingegangen am 7. November 1956)

Der große Vorteil der Ausführung eines analytischen Nachweises auf Filterpapier anstatt im Reagensglas liegt in den dafür notwendigen nur geringen Mengen, die sehr häufig noch kleiner sind als sie papierchromatographische Untersuchungen erfordern. Die Tüpfelreaktion wird deswegen und auch wegen der niedrigen Mengen an Reagens immer häufiger angewendet. Besonders für die meist nur in kleinsten Mengen vorhandenen Naturprodukte lassen sich beispielsweise mit Hilfe dieses Verfahrens eine größere Anzahl von Reaktionen durchführen.

Die Flavone sind trotz ihrer mehr oder weniger gelben Farbe papierchromatographisch im allgemeinen bei Tageslicht kaum zu erkennen, während im UV-Licht ein Erkennen und auch eine unspezifische Unterscheidung möglich ist. So werden die 3-Hydroxyflavone sichtbar, ihre Glucoside, die 5-Hydroxyflavone und ihre Glucoside hingegen bilden dunkle Flecken.

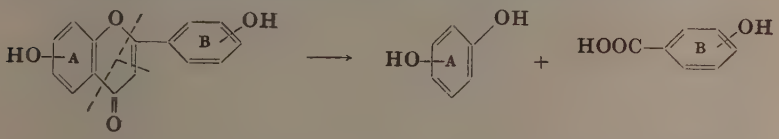
Vor kurzem haben wir zeigen können. daß in fester Form stabile Diazoniumverbindungen in wäßriger Lösung geeignete Reagenzien sind, um Flavone im Papierchromatogramm durch Farbstoffbildung sichtbar zu machen[1]. In gleicher Weise können die Diazoniumsalze auch zum Tüpfelnachweis der Flavone verwendet werden, wobei sie ebenso durch eine kräftige, verschiedene Farbstoffbildung, die im Tageslicht sichtbar ist, angezeigt werden.

Die Vorteile, in fester Form haltbare Diazoniumverbindungen für den Nachweis von Flavonen im Papierchromatogramm zu verwenden, wurden bereits in einer vorangegangenen Mitteilung beschrieben[2].

Es war möglich, aus den mit den Diazoniumverbindungen und Flavonen entstehenden Farben der gebildeten Farbstoffe konstitutionelle

Hinweise auf die untersuchten Flavone zu erhalten und z. B. das Vorliegen der Aglykon- oder Glucosidform festzustellen[2]. Es erschien jedoch damals noch zu früh, eine allgemein anwendbare Regel aufzustellen, da es nicht ausgeschlossen ist, daß sich das eine oder das andere Flavon einer solchen Regel nicht einordnen würde. Soweit die jetzt durch den Tüpfeltest erhaltenen Ergebnisse die papierchromatographischen Resultate ergänzen und sich gewisse Gesetzmäßigkeiten erkennen lassen, soll darzustellen versucht werden, inwieweit aus der Farbe des gebildeten Reaktionsproduktes auf die Konstitution der Flavone geschlossen werden kann. Selbstverständlich kann nicht erwartet werden, daß der Tüpfeltest oder die Papierchromatographie, für sich allein oder gemeinsam angewendet, bei der Untersuchung der Flavone weitere Charakterisierungen, von Ausnahmen abgesehen, überflüssig machen oder die klassischen Methoden verdrängen sollen.

Bei einer Vorstellung, daß das Flavonmolekül sich derart aufspaltet, daß aus dem Hydroxybenzo-γ-pyron das Phenol und aus dem hydroxylierten Seitenphenyl die entsprechende Hydroxybenzoesäure nach folgendem Schema entstehen, ergeben sich für die Anzahl der zu erwartenden



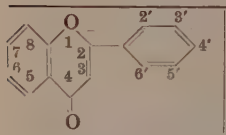
Phenole nicht viele Möglichkeiten. Außerdem bilden verschiedene Flavone die gleichen Phenole. Dagegen liegen die Verhältnisse für die entstehenden Hydroxybenzoesäuren günstiger und übersichtlicher. *Robinson*[3] gibt für die C_6—C_3—C_6- oder Flavan-Gruppe an, daß der Ring A im allgemeinen eine Phloroglucinorientierung aufweist, während die Resorcinanordnung zwar auch (Butin, Fisetin u. a.), aber weniger häufig angetroffen wird. Der Ring B hat dagegen die Orientierung der Hydroxyle der C_6—C_3-Gruppe. Die untersuchten Flavonaglucone geben bei Verwendung z. B. von diazotiertem 4-Amino-3,6-dimethoxy-4′-nitroazobenzol (I; Echtschwarzsalz K*) als Reagens bzw. nach vorstehendem Spaltungsschema folgende Farben bzw. Phenole und Hydroxybenzoesäuren (Tab. 1).

Wie in nachstehender Tabelle gezeigt ist, läßt sich aus den zu erwartenden Phenolen das unterschiedliche Verhalten der Farbstoffbildung der Flavone nicht ableiten, dagegen aber aus den entstehenden, sich mehr unterscheidenden Hydroxybenzoesäuren. Aus der Zusammenstellung geht eindeutig hervor, daß solche Flavone, die Hydroxybenzoesäure mit Hydroxygruppen in 4- und 2,4-Stellung, bzw. einer Methoxygruppe in 4-, bzw. einer Hydroxygruppe in 3- nud einer Methoxygruppe

* Zu beziehen durch Serumvertrieb Marburg, G. m. b. H.

in 4-Stellung ergeben, mit Echtschwarzsalz K einen blauen Farbstoff bilden. Dagegen ergeben Flavone, die Hydroxybenzoesäuren mit Hydroxygruppen in 3,4- bzw. 3,4,5-Stellung oder einer Methoxygruppe in 3-Stellung und einer Hydroxygruppe in 4-Stellung bilden, mit Echtschwarzsalz K einen gelben Farbstoff.

Tabelle 1



Trivialname	Rk. mit I	Hydroxybenzoesäure	Phenol
Morin	GrBl	2,4	1,3,5
Quercetin	G	3,4	1,3,5
Kämpferol	Bl	4	1,3,5
Robinetin	G	3,4,5	1,3
Fisetin	G	3,4	1,3
3′-Methoxyfisetin	G	$3(OCH_3)$,4	1,3
Luteolin	G	3,4	1,3,5
Diosmetin	Bl	$3,4(OCH_3)$	1,3,5
Apigenin	Bl	4	1,3,5
Acacetin	Bl	$4(OCH_3)$	1,3,5
Scutellarein	V	4	1,3,4,5
Dihydroquercetin	G	3,4	1,3,5
Rhamnetin	G	3,4	$1,3,5(OCH_3)$
Isorhamnetin	G	$3(OCH_3)$,4	1,3,5
Hesperetin	Bl	$3,4(OCH_3)$	1,3,5
d-Catechin	Bl		

3,5,7,2′,4′			
3,5,7,3′,4′			
3,5,7,-,4′			
3,-,7,3′,4′,5′			
3,-,7,3′,4′			
-,5,7,3′,4′			
-,5,7,-,4′			
-,5,7,-,4′(OCH_3)			
-,5,6,7,4′			
3,5,7((OCH_3),3′,4′			
3,5,7,3′(OCH_3),4′			

Die Abkürzungen in dieser und den folgenden Tabellen bedeuten: Bl = blau, BlV = blauviolett, BlGr = blau-grün, Br = braun, D = dunkel, G = gelb, Gr = grün, GGrau = gelbgrau, GGr = gelbgrün, GO = gelborange, Ol = oliv, R = rot, RO = rotorange, RV = rotviolett, V = violett, VBl = violettblau, W = weiß, ! = kräftig leuchtend, ( ) = schwach sichtbar, (( )) = sehr schwach sichtbar.

Zusammengefaßt ergibt sich folgende Übersicht der Hydroxybenzoesäuren aus dem Seitenphenyl:

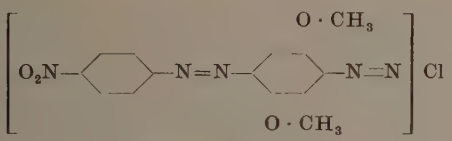
Blauer Farbstoff: 4-, 2,4-, $4(OCH_3)$-, $3,4(OCH_3)$-Hydroxybenzoesäure
Gelber Farbstoff: 3,4-, 3,4,5-, $3(OCH_3)$,4- Hydroxybenzoesäure

Aus den gebildeten Phenolen läßt sich in gleicher Weise eine solche scharfe Trennung nicht ableiten.

Bei spektrographischer Untersuchung der gebildeten Farbstoffe zeigt sich, daß die Absorptionsmaxima eine noch weitergehende Differenzierung der Flavone ermöglichen. Mit der Auswertung der spektrographischen Messungen sollen vorstehende Ergebnisse in einer weiteren Mitteilung ergänzt werden. Das Verhalten der entstehenden Farbstoffe bei der Papierchromatographie wird ebenfalls a. a. O.[4] beschrieben.

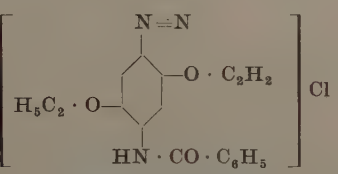
Zur Verwendung gelangten die folgenden drei Diazoniumsalze:

I



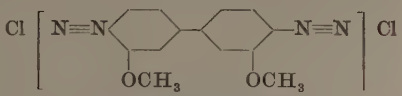
*Echtschwarzsalz K**
(Diazotiertes 4-Amino-3,6-dimethoxy-4′-nitro-azobenzol)

II



*Echtblausalz BB**
(Diazotiertes 1-Amino-4-benzoylamido-2,5-diäthoxybenzol)

III



*Echtblausalz B**
(Tetraazotiertes Di-o-anisidin)

Nach dem Ausfall der Reaktion vorstehender Diazoniumsalze mit den untersuchten Flavonen wird der Verwendung von Echtschwarzsalz K der Vorzug gegeben. Auf dem Markt befinden sich auch noch andere stabile Diazoniumsalze**, z. B. Echtschwarzsalz ANS, Echtbraunsalz V, Echtmarineblausalz RA, Echtgrünsalz B, die nach bisherigen orientierenden Untersuchungen auch brauchbar sind.

Die durch alkalischen Aufschluß der Flavone entstehenden Phenole sind in der Hauptsache Resorcin und Phloroglucin. Das Verhalten der verschiedenen Phenole zu den stabilen Diazoniumsalzen kann nach der alkalischen Spaltung der Phenyl-benzo-γ-pyron-Derivate im Tüpfeltest geprüft werden und bietet eine Möglichkeit zur Feststellung sehr geringer Mengen. Die oben formelmäßig wiedergegebenen Diazoniumsalze I, II und III geben mit den untersuchten Phenolen, Brenzcatechin, Resorcin, Hydrochinon, Pyrogallol und Phloroglucin, die im Versuchsteil beschriebenen Farbreaktionen (vgl. Tabelle 2).

---

* Zu beziehen durch Serumvertrieb Marburg G. m. b. H.

** Zu beziehen durch Farbwerke Hoechst A. G., Frankfurt/Main-Hoechst.

Resorcin und Phloroglucin werden mit den drei Diazoniumsalzen durch einen charakteristischen Farbstoff, der im Tageslicht sichtbar ist, angezeigt; außerdem Pyrogallol mit II und III. Im UV-Licht sind Resorcin, Pyrogallol und Phloroglucin bis zu 1 μg durch II und III durch eine starke Farbintensität gekennzeichnet. An Hand von Vergleichen der fünf Phenole ergibt sich ein beträchtlicher Unterschied in den entstehenden Farben und zeigt sich gleichzeitig eindrucksvoll die ausgezeichnete Brauchbarkeit von I, II und III als Reagens. Von Bedeutung ist das Verhalten von Phloroglucin, das als weitaus häufigstes Spaltprodukt beim alkalischen Abbau der Flavone auftritt[3]. Phloroglucin wird sogar noch in einer Menge von 0,1 μg mit allen drei Diazoniumverbindungen durch einen blauen Farbstoff, der im Tageslicht sichtbar ist, angezeigt.

Neben der phenolischen Komponente sind die Hydroxybenzoesäuren das andere wichtige Spaltprodukt, wenn es sich um 3- und 5-Hydroxyflavone handelt.

Das oben angegebene vereinfachte Spaltschema durch alkalischen Abbau trifft aber nur zu, wenn die 3- und 5-Hydroxyflavonstruktur vorliegt. Bei der alkalischen Aufspaltung der Flavanone und Isoflavone entsteht zwar keine andere phenolische Komponente, aber aus dem Flavanon entsteht aus dem Seitenphenyl die entsprechende Zimtsäure und aus dem Isoflavon neben Ameisensäure die entsprechende Phenylessigsäure.

Bei den in Tabelle 2 angeführten Hydroxy-benzo-γ-pyron-Derivaten handelt es sich um die in 3- und 5-Stellung substituierten Vertreter. Es lag daher nahe, zu untersuchen, ob die mit den stabilen Diazoniumsalzen und den Phenolen erhaltenen, stark voneinander verschiedenen Farben auch bei den beim alkalischen Abbau von Flavonen gebildeten Hydroxybenzoesäuren mit denselben Reagenzien auftreten und dadurch eine Unterscheidung und Bestimmung möglich gemacht werden kann.

Wie *Block*, *Durrum* und *Zweig*[5] feststellen, ist für die Papierchromatographie der Phenole und aromatischen Säuren bis jetzt keine vollständige Übersicht bekannt geworden und das Verhalten der zum Nachweis gebräuchlichen Reagenzien noch nicht für alle Substanzen geprüft.

Bei einer Bestätigung, daß sowohl Phenol als auch Carbonsäuren durch die in dieser Arbeit verwendeten stabilen Diazoniumsalze gleichzeitig, in geringen Mengen und durch eindeutige Farbunterschiede nachgewiesen werden können, wäre eine Aufarbeitung der durch Alkaliabbau erhaltenen Spaltprodukte durch Unterteilung in einen in Hydrogencarbonat löslichen und unlöslichen Anteil nicht mehr notwendig. Darüber hinaus eröffnet das durch die Bildung stark farbiger Reaktionsprodukte gekennzeichnete Verhalten der Phenole und die niedere Nachweisgrenze die Aussicht, die Ergebnisse auf Mikrogrammengen von Flavonen zu übertragen, und zwar durch Elution papierchromatographisch auf-

getrennter, sonst nur schwierig auf präparativem Weg isolierbarer Flavone, ihren alkalischen Abbau und die Bestimmung der Spaltprodukte nach papierchromatographischer Trennung durch eine sichere Farbreaktion und den R_f-Wert oder durch den Tüpfeltest nach Zerlegung der Spaltprodukte in den phenolischen und sauren Anteil. Die mikrochemische Methodik muß in einigen Punkten den besonderen Verhältnissen angepaßt werden. Ein solcher Weg würde ausreichende Beweise für konstitutionelle Unterlagen vermitteln, wie sie nicht besser, aber umständlicher mit größeren Mengen, die doch nur zu gleichen Ergebnissen führen, erhalten werden. In zunächst orientierenden Versuchen mit Flavonolen konnte festgestellt werden, daß der alkalische Abbau und der Nachweis der Spaltprodukte, auch wenn nur 20 bis 40 μg des Phenyl-benzo-γ-pyron-Derivates eingesetzt werden, durchaus möglich ist.

Bei der Annahme, daß sich z. B. aus den beiden isomeren Flavonolen Morin und Quercetin bei dem alkalischen Abbau die theoretischen Mengen an Dihydroxybenzoesäure und Phloroglucin bilden, würden aus 20 μg Ausgangsmaterial etwa 10 μg Säure und etwa 8 μg Phenol entstehen. die sich bei nur 50%iger Ausbeute zwar entsprechend vermindern, aber trotzdem noch groß genug sind, um nachweisbar zu sein. Die Zahlen zeigen, daß die Voraussetzungen für die vorgeschlagene Methodik durchaus realisierbar sind, nachdem die Papierchromatographie und der Tüpfeltest für die angegebenen Mengen zur Methode der Wahl wurden. Die Arbeitsweise und die Bestimmung der Spaltprodukte, die bei der alkalischen Hydrolyse von 20 bis 40 μg Flavon anfallen, soll später beschrieben werden[6].

Bei der Verwendung von Mikrogrammen an Stelle von Milligrammen tritt die analytische Chemie in eine neue Entwicklungsphase. Ganz besonders werden aber für den Nachweis derart geringer Mengen nicht nur spezifische, sondern auch stark selektive Reagenzien entwickelt werden müssen.

Die Durchsicht des Schrifttums ergab, daß schon vor einiger Zeit *Lindstedt* und *Misiorny*[7] eine Methodik zur alkalischen Spaltung von 0,5 bis 2 mg Flavonen angegeben haben. Vor kurzem hat *Brune*[8] die Arbeitsweise von *Lindstedt* und *Misiorny* mit Erfolg unter Einsatz von 1000 μg zur Bestimmung der Struktur der Aglukone der aus Citrus grandis und Atalantia cyclanica isolierten Phenyl-benzo-γ-pyron-Glykoside angewendet und die Spaltprodukte nach papierchromatographischer Auftrennung mit bis-diazotiertem Benzidin und mit Eisen(III)-chlorid nachgewiesen. *Kulkarni* und *Merchant*[9] haben eine ähnliche Identifizierung von Anthoxanthinen vorgeschlagen, die aber etwa 60 mg Substanz, also die bei halbmikrochemischen Arbeiten üblichen Mengen, erfordert. Nach der Alkalischmelze und saurer Aufarbeitung werden die in Diäthyläther löslichen Spaltprodukte papierchromatographisch getrennt und Phenole,

Ketone und Phenolcarbonsäuren mit diazotierter Sulfanilsäure durch charakteristische Farbstoffbildung sichtbar gemacht. Die Autoren konnten auf diese Weise das Abbauprodukt Phloroglucin aus entmethyliertem Swertenin identifizieren. Die bereits bekannten Arbeitsweisen unterscheiden sich aber grundlegend von der von uns vorgeschlagenen und verwendeten vor allem durch die wesentlich herabgesetzte Menge an Ausgangsmaterial, die auch papierchromatographisch entweder mit dem Blatt oder dem Rundfilter ohne Mühe zu bewältigen ist.

Lindstedt und *Misiorny* haben bei dem alkalischen Abbau der Flavone den phenolischen Anteil Strobobanksin und Strobochrysin. *Bate-Smith* und *Swain*[10] das Keton und die Säure, die bei alkalischer Spaltung von 2′.4.4′-Trihydroxychalkon entstehen, papierchromatographisch nachgewiesen. Bei unseren Untersuchungen kam es darauf an, ob mit den stabilen Diazoniumsalzen die verschiedenen Säuren identifiziert werden können, da sie den wesentlichen Teil des obenstehenden Spaltungsschemas darstellen, während die Anzahl der möglichen Phenole weniger groß und daher weniger wichtig ist. *Swain*[11] hat die beim Abbau des Chalkons auftretende p-Hydroxybenzoesäure mit diazotiertem p-Nitroanilin in sodaalkalischer Lösung nachgewiesen. *Deshusses*[12] empfiehlt ebenfalls diazotiertes p-Nitranilin zum Nachweis der p-Hydroxybenzoesäure. Der Nachweis dieser Säure ist mit *Millon*-Reagens möglich, nur ist die Verwendung für ein Papierchromatogramm schwierig, obwohl dafür eine Anleitung gegeben wurde[13]. *Feigl*[14] gibt als untere Nachweisgrenze für p-Hydroxybenzoesäure im Tüpfeltest 2 μg an.

Bate-Smith[15] gibt bei der Verwendung von Diazoniumverbindungen als Reagenzien das Auftreten verschiedener Farben bei der Kennzeichnung phenolischer Pflanzeninhaltsstoffe als zusätzlichen Vorteil an und empfiehlt diazotiertes p-Nitroanilin in 2-n Natriumacetat.

Das Verhalten der verwendeten stabilen Diazoniumsalze gegenüber den verschiedenen Hydroxybenzoesäuren war in zweifacher Hinsicht zu klären, und zwar erstens: durch welche Reagenzien werden die Säuren sicher angezeigt und bis zu welcher Menge ist der Nachweis sicher, und zweitens: wie verhalten sich die nachzuweisenden Säuren bei der Papierchromatographie unter Berücksichtigung der noch feststellbaren Mengen und des Einflusses der Lösungsmittel.

Nach der Tabelle 2 können als saure Spaltprodukte der Flavone folgende Hydroxybenzoesäuren bzw. Methyläther erwartet werden: 4-Hydroxybenzoesäure, Anissäure, β-Resorcylsäure, 2-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure, Protocatechusäure, Vanillinsäure, Isovanillinsäure, Veratrumsäure und Gallussäure.

Die Herstellung der Säuren erfolgte auf verschiedenen Wegen. 4-Hydroxybenzoesäure wurde durch alkalische Verseifung und der Methyläther durch Alkylieren mit p-Toluolsulfonsäuremethylester von

4-Hydroxybenzoesäuremethylester, der als Nipasol M* auf dem Markt ist, erhalten. Außerdem wurde aus dem Destillationsrückstand von Anisaldehyd die Anissäure isoliert. β-Resorcylsäure entstand in guter Ausbeute aus Resorcin, Alkalihydrogencarbonat und Einleiten von Kohlensäure[16]. 2-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure wurde aus β-Resorcylsäure, Kalilauge und p-Toluolsulfonsäuremethylester hergestellt und neben 2-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure auch ihr Methylester isoliert, der nach dem Verseifen in die freie Säure übergeführt wurde.

Protocatechusäure wurde durch Chlorieren von p-Hydroxybenzoesäure zu 3-Chlor-4-hydroxybenzoesäure und hydrolytischer Abspaltung des Chlors gebildet[17].

Vanillinsäure entsteht in guter Ausbeute durch Oxydation von Vanillin mit Silberoxyd und Alkalihydroxyd[18]. Die Isovanillinsäure wurde aus Vanillin und Dimethylsulfat[19] bzw. mit p-Toluolsulfonsäuremethylester zum Veratrumaldehyd, Oxydation mit Wasserstoffperoxyd und Natronlauge zur Veratrumsäure nach dem kürzlich von *Dobrowsky*[20] veröffentlichten Verfahren und Spaltung der 3-OCH_3-Gruppe mit 28%iger Bromwasserstoffsäure nach *Perkin* und *Stoyle*[21] hergestellt. Mit ausgezeichneten Ausbeuten verlief die von *Dobrowsky*[20] beschriebene Überführung von Piperonal in alkalischer Lösung mit Wasserstoffperoxyd zur Piperonylsäure. Abspaltung der Methylengruppe und Methylieren mit p-Toluolsulfonsäuremethylester in alkalischer Lösung. Verseifung des gleichzeitig gebildeten Veratrumsäuremethylesters und Abscheidung der Veratrumsäure. Die Gallussäure wurde als handelsübliches Produkt verwendet.

Außerdem wurde noch geprüft, ob Zimtsäure, p-Cumarsäure, Kaffeesäure und Chlorogensäure, interessante Inhaltsstoffe von Pflanzen, mit den festen Diazoniumsalzen im Tüpfeltest eine charakteristische Farbstoffbildung zeigen.

Für die Herstellung der p-Cumarsäure wurde p-Hydroxybenzaldehyd mit Malonsäure in Pyridin umgesetzt und für die der Kaffeesäure wurde Piperonal zu Protocatechualdehyd entalkyliert und dieser mit Malonsäure in Pyridin kondensiert. Chlorogensäure wurde aus grünen Kaffeebohnen isoliert[22].

Die Säuren wurden in Methanol gelöst, Mengen von 5, 3 und 1 µg auf S & S 2043a aufgetragen und anschließend mit Diazoniumsalzlösung besprüht. Die Säuren mit einer Methoxygruppe in 4-Stellung bzw. zwei Methoxygruppen in 3- und 4-Stellung und ohne weiteren Substituenten reagieren mit keiner Diazoniumverbindung, hingegen reagieren 2,4-Dihydroxy- und 3.4.5-Trihydroxy-benzoesäure mit allen Diazoniumverbindungen. Die verschiedenen Hydroxybenzoesäuren zeigen nicht die charakteristischen Farbreaktionen wie die Phenole. Das Echtschwarzsalz K

* Hersteller: Fa. Nipa-Laboratorien G. m. b. H., Berlin.

wurde daher noch in einem alkalischen Puffer gelöst und zum Sprühen verwendet mit dem Ergebnis, daß die Säuren sich so verhalten, wie die in Tabelle 2 angegebenen Flavone, die eine blaue bzw. gelbe Farbreaktion zeigen.

Unter der Voraussetzung, daß die Unterschiede zwischen den Hydroxybenzoesäuren auch papierchromatographisch eintreten, kann das zu untersuchende Flavon bereits in eine der beiden Hauptgruppen eingereiht werden. Die weitere Identifizierung der Säure ist dann gegebenenfalls aus dem R_f-Wert möglich oder durch Anwendung anderer Reagenzien, wie sie in Tabelle 4 aufgeführt sind, von denen Nitrazol C. F. extra in Kaliumdihydrogenphosphat-Borax-Puffer sich durch die Bildung unterschiedlicher Farbstoffe auszeichnet.

Eine andere Modifizierung des Nachweises der Hydroxybenzoesäuren bzw. der Phenole mit den stabilen Diazoniumsalzen besteht darin, nicht die nachzuweisende Substanz zu chromatographieren, sondern das bei der alkalischen Spaltung erhaltene Gemisch nach dem Neutralisieren mit den Diazoniumsalzen zu kuppeln und den gebildeten Diazofarbstoff zu chromatographieren. Eine ähnliche Methode wurde bereits von *Hossfeld*[23] zur Identifizierung von Phenolen durch Kuppeln mit diazotierter Sulfanilsäure verwendet.

Die Beschreibung der Nachweise wird unter Berücksichtigung der verschiedenen papierchromatographischen Methoden und der analytischen Untersuchung der bei der Alkalischmelze auftretenden Spaltprodukte gemeinsam mit der Arbeitsweise des Abbaues der Flavone erfolgen[6].

Das im Versuchsteil wiedergegebene Verhalten der Flavone und ihrer Glykoside gegenüber den drei Diazoniumsalzen Echtschwarzsalz K, Echtblausalz B und Echtblausalz BB, gibt an, bis zu welcher Menge im Tages- und im UV-Licht die Farbstoffbildung sichtbar ist. In gleicher Weise ist auch das Verhalten von Flavonen und ihren Glykosiden im UV-Licht ohne Zusatz von Reagenzien angegeben (Tabelle 6). Der Vergleich der sichtbaren Mengen in den Tabellen mit und ohne Reagenzien zeigt zwar, daß sich im UV-Licht geringere Mengen der untersuchten Verbindungen ohne Reagens anzeigen, aber diese Feststellung ist nur relativ, weil erstens die jeweiligen Flavone bekannt sind, und zweitens die auftretenden Farben, von einigen Ausnahmen abgesehen, entweder gelb sind oder einen dunklen Fleck zeigen. Ohne Reagenzien ist daher eine Feststellung, ob und um welches Flavon es sich handelt, nicht nur schwierig, sondern häufig unmöglich. Im Tageslicht sind die Schwierigkeiten, das Vorliegen eines Flavons überhaupt festzustellen, noch größer. Demgegenüber sind die mit den Diazoniumsalzen und den Benzo-γ-pyron-Derivaten auftretenden farbigen Verbindungen bereits im Tageslicht zu erkennen und geben durch das Auftreten verschiedener Farben schon Anhaltspunkte

für das so nachgewiesene Flavon. Die Nachweismenge im Tageslicht beträgt durchschnittlich 1 μg (Tabellen 7 bis 10). Damit dürfte eine Größenordnung erreicht sein, die bei Tüpfelreaktionen erfaßt wird. Durch das Auftreten der im Tageslicht sichtbaren, verschiedenen Farben, die mit den zahlreichen isomeren Hydroxy-benzo-γ-pyronen auch bei niederen Konzentrationen mit nur einem Reagens auftreten, bestehen Möglichkeiten zur Unterscheidung der Aglykon- oder Glykosidform und zu Aussagen über die konstitutionellen Verhältnisse. Dieselben Vorteile werden nur noch von dem Tetraphenyl-diboroxyd erreicht bzw. davon übertroffen[24].

Der Verfasser hat Herrn Dr. *H. Harms*, Bayerwerk, Leverkusen, für das der Verwendung stabiler Diazoniumsalze zum Mikrogrammnachweis von Flavonen gezeigte Interesse und für eine anregende Diskussion, den Farbwerken Hoechst, A. G., für die zur Verfügung gestellten Diazoniumsalze und Fräulein *Elisabeth Buhl* und Frau *Marlis Mayer* für die geschickte Durchführung der organisch-präparativen Arbeiten und der analytischen Nachweise zu danken.

Experimenteller Teil

Die Flavone wurden in Methanol zu 0,1 und 0,01% gelöst und mit einer Meßpipette von der 0,1%igen Lösung 0,01 ml = 10 μg, 0,005 ml = 5 μg, 0,001 ml = 1 μg und von der 0,01%igen Lösung 0,005 ml = 0,5 μg, 0,003 ml = 0,3 μg und 0,001 ml = 0,1 μg auf Filterpapier (S & S 2043a) aufgetragen. Anschließend wurden die Papiere durch eine 0,1%ige wäßrige Lösung der Diazoniumsalze I, II und III gezogen und im Trockenschrank bei etwa 80° C getrocknet. Die Beurteilung der Farben und die Feststellung der Grenze der Sichtbarkeit erfolgte sowohl im Tages- als auch im UV-Licht. In gleicher Weise werden die aufgetragenen Mengen der Flavone vor der Umsetzung mit den Diazoniumsalzen im UV-Licht im Hinblick auf Farbe und Grenze der Sichtbarkeit festgelegt. Die Angaben sind in der Tabelle 2 enthalten.

Tabelle 2. Verhalten der Phenole gegenüber den Diazoniumsalzen

Phenol	Tageslicht		UV-Licht	
	μg	Farbe	μg	Farbe
	Echtschwarzsalz K (I)			
Brenzcatechin	0,1	G	0,3	Br
Resorcin	0,1	VBl	0,1	Bl
Hydrochinon	0,1	G	0,3	Br
Pyrogallol	0,1	RV	0,1	D
Phloroglucin	0,1	Bl	0,1	Bl

(Fortsetzung der Tabelle 2)

Phenol	Tageslicht		UV-Licht	
	µg	Farbe	µg	Farbe
	Echtblausalz BB (II)			
Brenzcatechin	1	((V))	1	V
Resorcin	0,3	RV	0,3 (1,0)	R (R!)
Hydrochinon	—	—	1	((V))
Pyrogallol	0,3	R	0,3 (1,0)	RV (RV!)
Phloroglucin	0,1	Bl	0,3 (1,0)	Bl (Bl!)
	Echtblausalz B (III)			
Brenzcatechin	1	W	1	V
Resorcin	0,1	BlV	0,1 (1,0)	(Bl) (RV!)
Hydrochinon	1	W	1	V
Pyrogallol	0,3	R	0,3 (1,0)	R (R!)
Phloroglucin	0,1	Bl	0,1 (1,0)	Bl (Bl!)

Zur besseren Übersicht enthält die Tabelle 1 außer der Angabe der Substitutionsorte für die Hydroxylgruppen gleichzeitig auch die gebräuchlichen Trivialnamen der Phenyl-benzo-γ-pyron-Derivate.

Eine gewisse Schwierigkeit bereitet die eindeutige Beschreibung der Farbe des gebildeten Farbstoffes, dessen Nuancierung häufig von verschiedenen Beobachtern anders beurteilt wird. Der Tüpfeltest bietet aber keine Möglichkeit, z. B. durch absorptionsspektrographische Unter-

Tabelle 3

Phenol	Diazoniumsalze					
	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Resorcin	Br	BlV	V	O	V	V
Resorcindimethyläther	—	(RV)	((V))	((O))	—	(R)
Pyrogallol	GGr	(BlV)	((Bl))	Grau	W	(V)
Phloroglucin	Br	Bl	Bl	R	Bl	Bl

suchung die Wellenlängen maximaler Absorption festzustellen. Nach den bei praktischer Anwendung der beschriebenen Diazoniumsalze als Reagens auftretenden Farbdifferenzen bei der Untersuchung unbekannter Flavone kann aber ohne weiteres z. B. Kämpferol von Quercetin mit Sicherheit unterschieden werden. Der gleiche Farbunterschied tritt auch bei einer papierchromatographischen Trennung auf, wenn Kämpferol und Quercetin als Gemisch vorliegen. Der R_f-Wert erhält dann erst nach dem Tauchen oder Sprühen mit dem Diazoniumsalz seine Bestätigung.

Für Resorcin und Phloroglucin sind alle drei Diazoniumsalze als Reagens gleichwertig. Die Sichtbarkeit im Tageslicht ist bis zu einer geringeren Konzentration als im UV-Licht gegeben.

Tabelle 4. Verhalten der Benzolcarbonsäuren gegenüber den Diazoniumsalzen

Benzolcarbonsäure (Trivialname)	Substituenten	Diazoniumsalz								
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Benzoesäure ...	—; 1(COOH)									
Salicylsäure ...	2(OH); 1(COOH)	(RV)			—	(R)	(R)	—	—	—
p-Hydroxy-benzoesäure .	4(OH); 1(COOH)	(R)		(G)	R	R	R	(R)	—	((R))
Anissäure	$4(OCH_3)$; 1(COOH)			—			—	—		—
β-Resorcyl-säure	2,4(OH); 1(COOH)	Bl	RV	RV	Br	Bl	V	O	(V)	V
2-Hydroxy-4-methoxy-benzoesäure .	2(OH),$4(OCH_3)$; 1(COOH)	V		(Br)	((Br))	BlV	RV	O	—	—
Protocatechu-säure	3,4(OH); 1(COOH)	W	((Bl))	W	(G)	W	W	(Bl)	(W)	((R))
Vanillinsäure ..	3(OCH_3),4(OH); 1(COOH)	RV		G	V	RV	V	R	—	((R))
Isovanillin-säure	3(OH),$4(OCH_3)$; 1(COOH)	RV		—	V	RV	V	R	—	—
Veratrumsäure.	3,4(OCH_3); 1(COOH)	—								
Gallussäure ...	3,4,5(OH); 1(COOH)	(Bl)	R	(RV)	GGr	V	V	(V)	W	V
Kaffeesäure ...	3,4(OH); 1(CH=CH—COOH)	W	((Gr))	W	(G)	W	W	(Bl)	W	(RV)
p-Cumarsäure .	4(OH); 1(CH=CH—COOH)	(RV)	((Br))	((R))	(G)	RV	((V))	R	(W)	(R)
Chlorogensäure		W	(W)	W	(Gr)	W	W	(Bl)	W	—

Außerdem wurden nachfolgende Diazoniumsalze auf ihr Verhalten gegenüber Phenolen geprüft:

IV: Nitrazol CF extra: 0.3% in Kaliumhydrogenphosphat-Borax-Puffer
V: Echtschwarzsalz ANS*
VI: Echtmarineblausalz RA*
VII: Echtrotsalz AL
VIII: Echtbraunsalz V*
IX: Echtblaugrünsalz B*

Die Diazoniumsalze V bis IX wurden in 0.3% wäßrig-alkoholischer Lösung (50%ig) frisch bereitet und die Lösung filtriert. Von den Phenolen wurden 5. 3 bzw. 1 μg auf Papier (Schleicher & Schüll 2043a) aufgetragen und mit der Diazoniumsalzlösung besprüht. Die Farbintensität der verschiedenen Phenolmengen war praktisch gleich.

Die Diazoniumsalze I bis IX wurden in wäßrig-alkoholischer Lösung versprüht. außerdem das Echtschwarzsalz K nach dem Auflösen in Kaliumdihydrogenphosphat-Natriumtetraborat-Puffer mit und ohne Zusatz von Natronlauge. bzw. in 10%iger Natriumcarbonatlösung. Die Säuren wurden in Mengen von 5. 3 und 1 μg auf S & S-Papier 2043a aufgetragen.

Tabelle 5

Benzolcarbonsäure	Substituenten	Echtschwarzsalz K $Na_2B_4O_7$—KH_2PO_4-Puffer	
		ohne NaOH	mit NaOH
Benzoesäure	—; 1(COOH)	(W)	—
p-Hydroxybenzoesäure	4(OH); 1(COOH)	(V)	(Bl)
Anissäure	4(OCH_3); 1(COOH)	—	—
β-Resorcylsäure	2,4(OH); 1(COOH)	Bl	BlV
2-Hydroxy-4-methoxy-benzoesäure	2(OH); 4(OCH_3); 1(COOH)	—	—
Protocatechusäure	3,4(OH); 1(COOH)	G	G
Vanillinsäure	3(OCH_3); 4(OH); 1(COOH)	V	BlGr
Isovanillinsäure	3(OH); 4(OCH_3); 1(COOH)	V	Bl
Veratrumsäure	3,4(OCH_3); 1(COOH)	W	—
Gallussäure	3,4,5(OH); 1(COOH)	Br	(Br)
Kaffeesäure	3,4(OH); 1(CH=CH—COOH)	G	G
p-Cumarsäure	4(OH); 1(CH=CH—COOH)	BlV	Bl
Chlorogensäure		G	G

Bemerkung zu den mit Echtschwarzsalz K auftretenden Farben: Die eindeutige Beschreibung der beim Tüpfeltest entstehenden Farben

* Zu beziehen durch Farbwerke Hoechst A. G., Frankfurt/Main-Hoechst.

Tabelle 6. Nachweisgrenze der Flavone und Flavonglucoside im UV-Licht

Stellung der OH-Gruppen nach der Formel in Tabelle 1	Glucosid	Trivialname	µg	UV
3,5,7,2′,4′	—	Morin	0,01	Gr
3,5,7,3′,4′	—	Quercetin	0,01	G
3,5,7(OCH_3),3′,4′	—	Rhamnetin		G
3,5,7,3′(OCH_3),4′	—	Isorhamnetin		G
3,5,7,3′,4′-	3-glucosid	Quercitrin	0,01	D
3,5,7,3′,4′-	3-galaktosid	Hyperin	0,01	D
3,5,7,3′,4′-	3-rhamnoglucosid	Rutin	0,01	D
3,5,7,4′	—	Kämpferol	0,1	GGr
3,5,7,4′-	3-diglucosid	Kämpferin	0,01	D
3,-,7,3′,4′	—	Fisetin	0,01	GGr!
3,-,7,3′(OCH_3),4′	—	3′-Methoxyfisetin	0,01	G!
3,-,7,3′,4′,5′	—	Robinetin	0,01	G!
-,5,7,4′	—	Apigenin	0,03	D
-,5,7,4′-	7-apioseglucosid	Apiin	1	D
-,5,7,3′,4′	—	Luteolin	0,03	D
-,5,7,3′,4′(OCH_3)	—	Diosmetin	0,01	D
-,5,7,3′,4′(OCH_3)-	7-rhamnoglucosid	Diosmin	1	D
-,5,7,4′(OCH_3)	—	Acacetin	1	D
-,5,7,4′(OCH_3)-	7-dirhamnosid	Acaciin	1	D
-,5,6,7,4′	—	Scutellarein	0,3	D
-,5,6,7,4′-	glucuronsäure	Scutellarin	1	D
-,5,7,3′,4′(OCH_3)	—	Hesperetin	1	BlGr
-,5,7,3′,4′(OCH_3)-	7-rhamnosid	Hesperidin	1	(Gr)
3,5,7,3′,4′-	2,3-	Dihydroquercetin*		Gr
3,5,7,3′,4′-	flavan	d-Catechin	1	Ol
		Vitexin	0,05	D
		Vitexin-4′-rhamnosid	1	D
3(OCH_3),5,(6,7,3′,4′OCH_3)-		Artemisetin**		D

* Taxifolin.

** Von *Čekan* und *Herout*[25] aus der gleichen Pflanze (Artemisia absinthium L.) isoliert und als Artemetin bezeichnet, von *Tunmann* und *Isaak*[26] Artemisetin genannt.

Tabelle 7. Echtschwarzsalz K als Reagens im Tüpfeltest zum Nachweis von Flavonen und Flavonglucosiden

Stellung der OH-Gruppen nach der Formel in Tabelle 1	Glucosid	Trivialname	Tageslicht		UV-Licht	
			µg	Farbe	µg	Farbe
3,5,7,2′,4′	—	Morin	0,1	Bl	1	Gr
3,5,7,3′,4′	—	Quercetin	1 (0,1)	G(GGrau)	1	GGr
3,5,7(OCH$_3$),3′,4′	—	Rhamnetin		Br		Br
3,5,7,3′(OCH$_3$),4′	—	Isorhamnetin		G		G
3,5,7,3′,4′-	3-glucosid	Quercitrin	1 (0,1)	G(GGrau)	1	Br
3,5,7,3′,4′-	3-galaktosid	Hyperin	1 (0,1)	G(GGrau)	1	Br
3,5,7,3′,4′-	3-rhamnoglucosid	Rutin	1 (0,1)	G(GGrau)	1	Br
3,5,7,4′	—	Kämpferol	0,1	Gr	0,1	Gr
3,5,7,4′-	3-diglucosid	Kämpferin	1 (0,1)	Bl	0,1	Ol
3,-,7,3′,4′	—	Fisetin	1 (0,3)	G	0,3	G
3,-,7,3′(OCH$_3$),4′	—	3′-Methoxyfisetin	1 (0,1)	G	0,1	G
3,-,7,3′,4′,5′	—	Robinetin	1 (0,1)	G(Br)	0,1	G
-,5,7,4′	—	Apigenin	1 (0,1)	Bl	0,1	Ol
-,5,7,4′-	7-apioseglucosid	Apiin	1	(R)	0,1	Br
-,5,7,3′,4′	—	Luteolin	1 (0,1)	G(GGrau)	1	Ol
-,5,7,3′,4′(OCH$_3$)	—	Diosmetin	(0,1)	Bl	0,1	Ol
-,5,7,3′,4′(OCH$_3$)-	7-rhamnoglucosid	Diosmin	1	(R)	1	Ol
-,5,7,4′(OCH$_3$)	—	Acacetin	1 (0,5)	Bl	1	Ol
-,5,7,4′(OCH$_3$)-	7-dirhamnosid	Acaciin	5	R	1	Ol
-,5,6,7,4′	—	Scutellarein	0,1	BlV	(0,1)	Bl
-,5,6,7,4′-	glucuronsäure	Scutellarin	1 (0,1)	G	1	Br
-,5,7,3′,4′(OCH$_3$)	—	Hesperetin	1 (0,1)	Bl	1	Gr
-,5,7,3′,4′(OCH$_3$)-	7-rhamnosid	Hesperidin	1	R	1	G
3,5,7,3′,4′-	2,3-	Dihydroquercetin		Br		Br
3,5,7,3′,4′-	flavan	d-Catechin	0,1	Bl	0,3	D
		Vitexin	1	Bl	0,1	Ol
		Vitexin-4′-rhamnosid	(1)	Bl	0,1	Ol
3(OCH$_3$),5,(6,7,3′,4′OCH$_3$)-		Artemisetin	—	—	—	—

Tabelle 8. Echtblausalz B als Reagens im Tüpfeltest zum Nachweis von Flavonen und Flavonglucosiden

Stellung der OH-Gruppen nach der Formel in Tabelle 1	Glucosid	Trivialname	Tageslicht		UV-Licht	
			µg	Farbe	µg	Farbe
3,5,7,2′,4′	—	Morin	1 ((0,1))	RV	1	Gr
3,5,7,3′,4′	—	Quercetin	1 ((0,3))	RV	1	Bl
3,5,7(OCH$_3$),3′,4′	—	Rhamnetin		RV		RV
3,5,7,3′(OCH$_3$),4′	—	Isorhamnetin		RV		RV
3,5,7,3′,4′-	3-glucosid	Quercitrin	(1)	RV	1	Bl
3,5,7,3′,4′-	3-galactosid	Hyperin	(1)	RV	1	Bl
3,5,7,3′,4′-	3-rhamnoglucosid	Rutin	(1)	RV	1	Bl
3,5,7,4′	—	Kämpferol	0,1	RV	0,1	Br
3,5,7,4′-	3-diglucosid	Kämpferin	1	RV	1	R
3,-,7,3′,4′	—	Fisetin	(1)	RV	0,1	Gr
3,-,7,3′(OCH$_3$),4′	—	3′-Methoxyfisetin	((1))	RV	0,1	G!
3,-,7,3′,4′,5′	—	Robinetin	1	RV	0,1	G!
-,5,7,4′	—	Apigenin	(1)	RV	1	GO
-,5,7,4′-	7-apioseglucosid	Apiin	—	—	1	Ol
-,5,7,3′,4′	—	Luteolin	(1)	RV	1	Bl
-,5,7,3′,4′(OCH$_3$)	—	Diosmetin	1	RV	0,1	GO
-,5,7,3′,4′(OCH$_3$)-	7-rhamnoglucosid	Diosmin	—	—	1	Ol
-,5,7,4′(OCH$_3$)	—	Acacetin	(1)	RV	1	Br
-,5,7,4′(OCH$_3$)-	7-dirhamnosid	Acaciin	—	—	1	Ol
-,5,6,7,4′	—	Scutellarein	0,1	R	1; (0,1)	R!; R
-,5,6,7,4′-	glucuronsäure	Scutellarin	(1)	W	1	R
-,5,7,3′,4′(OCH$_3$)	—	Hesperetin	1	RV	1	R
-,5,7,3′,4′(OCH$_3$)-	7-rhamnosid	Hesperidin	((5))	RV	1	RO
3,5,7,3′,4′-	2,3-	Dihydroquercetin		RV		RV
3,5,7,3′,4′-	flavan	d-Catechin	1 ((0,1))	RV	1	Bl
		Vitexin	(1)	RV	0,1	Ol
		Vitexin-4′-rhamnosid	((1))	RV	1	Ol
3(OCH$_3$),5,(6,7,3′,4′OCH$_3$)-		Artemisetin		G		V

Tabelle 9. Echtschwarzsalz BB als Reagens im Tüpfeltest zum Nachweis von Flavonen und Flavonglucosiden

Stellung der OH-Gruppen nach der Formel in Tabelle 1	Glucosid	Trivialname	Tageslicht		UV-Licht	
			µg	Farbe	µg	Farbe
3,5,7,2′,4′	—	Morin	1 ((0,1))	V	0,05	D
3,5,7,3′,4′	—	Quercetin	1 ((0,3))	V	0,05	V
3,5,7(OCH_3),3′,4′		Rhamnetin		V		RV
3,5,7,3′(OCH_3),4′	—	Isorhamnetin		BlV		RV
3,5,7,3′,4′-	3-glucosid	Quercitrin	((1))	V	((5))	V
3,5,7,3′,4′-	3-galactosid	Hyperin	((1))	V	((1))	V
3,5,7,3′,4′-	3-rhamnoglucosid	Rutin	((1))	V	((10))	V
3,5,7,4′	—	Kämpferol	0,1	V	0,1	Gr
3,5,7,4′-	3-diglucosid	Kämpferin	—	—	—	—
3,-,7,3′,4′	—	Fisetin	(1)	V	0,01	Gr!
3,-,7,3′(OCH_3),4′	—	3-Methoxyfisetin	((5))	V	0,01	G!
3,-,7,3′,4′,5′	—	Robinetin	1	R	0,03	G!
-,5,7,4′	—	Apigenin	((1))	V	1	R
-,5,7,4′-	7-apioseglucosid	Apiin	—	—	—	—
-,5,7,3′,4′	—	Luteolin	(1)	V	1	V
-,5,7,3′,4′(OCH_3)	—	Diosmetin	(1)	V	0,3	R
-,5,7,3′,4′(OCH_3)-	7-rhamnoglucosid	Diosmin	—	—	—	—
-,5,7,4′(OCH_3)	—	Acacetin	((5))	V	1	R
-,5,7,4′(OCH_3)-	7-dirhamnosid	Acaciin	—	—	—	—
-,5,6,7,4′	—	Scutellarein	0,1	RV	1; 0,1	R!; R
-,5,6,7,4′-	glucuronsäure	Scutellarin	(1)	V	1	V
-,5,7,3′,4′(OCH_3)	—	Hesperetin	1	V	1	RV
-,5,7,3′,4′(OCH_3)-	7-rhamnosid	Hesperidin	—	—	((5))	G
3,5,7,3′,4′-	2,3-	Dihydroquercetin		BlV		RV
3,5,7,3′,4′-	flavan	d-Catechin	1 (0,1)	V	0,1	V!
		Vitexin	((5))	V	((1))	R
		Vitexin-4′-rhamnosid	—	—	—	—
3(OCH_3),5,(6,7,3′,4′OCH_3)-		Artemisetin	—	—	—	—

einiger Flavone ist, vor allem bei geringen Konzentrationen, schwer möglich. Deshalb wurde z. B. „Gelbgrau" und „Oliv" für die auftretenden Farbtöne verwendet.

Zusammenfassung

Unter Verwendung von neun stabilen Diazoniumsalzen wird gezeigt, daß mit Hilfe des Tüpfeltestes das Erkennen von Di- und Trihydroxybenzolen und das von aromatischen Hydroxysäuren in Mikrogrammengen durch charakteristische Farbstoffbildung möglich ist. Durch die hohe Empfindlichkeit des Nachweises von Hydroxybenzolen bzw. Hydroxybenzolcarbonsäuren ist es möglich, diese bei der Alkalischmelze der Hydroxyphenyl-benzo-γ-pyron-Derivate auftretenden Spaltprodukte im Tüpfeltest zu identifizieren.

Durch Anwendung des Tüpfeltestes wird das Verhalten von 28 Flavonen nach dem Umsetzen mit drei stabilen Diazoniumsalzen, diazotiertem 4-Amino-3,6-dimethoxy-4′-nitroazobenzol, diazotiertem 1-Amino-4-benzoylamido-2,5-diäthoxybenzol und tetraazotiertem Di-o-anisidin, und die Erfassungsgrenze im Tages- und im UV-Licht festgestellt. Auch mit Hilfe des Tüpfeltestes lassen sich bei Verwendung von diazotiertem 4-Amino-3,6-dimethoxy-4′-nitroazobenzol als Reagens die Flavonaglykone von den Flavonglykosiden unterscheiden und in gleicher Weise wie im Papierchromatogramm entstehen gelbe oder blaue Farbstoffe je nach der Konstitution der Hydroxyphenyl-benzo-γ-pyron-Derivate.

Summary

By means of nine stabilized diazonium salts it was shown that with the aid of the spot test it is possible to detect microgram quantities of di- and trihydroxybenzenes and of aromatic hydroxy acids through the formation of characteristic dyes. Because of the great sensitivity of the tests for hydroxybenzenes and hydroxybenzene carboxylic acids. it is possible to detect them by a spot test in the fission products of the alkali fusion of hydroxyphenyl-benzo-γ-pyrone derivatives.

By means of the spot test a study was made of the behavior of 28 flavones after reaction with 3 stable diazonium salts, and with diazotized 4-amino-3,6-dimethoxy-4′-nitro azobenzene. diazotized 1-amino-4-benzoylamino-2,5-diethyloxybenzene, and tetraazotized di-*o*-anisidine. The limits of identification were determined in daylight and in ultraviolet. Likewise, with the aid of the spot test, and using diazotized 4-amino-3,5-dimethoxy-4′-nitro azobenzene as reagent, it is possible to distinguish the flavone glycosides and the flavonaglycones; in the same manner as in the paper chromatogram, blue or yellow dyestuffs are produced, depending on the constitution of the hydroxyphenyl-benzo-γ-pyrone derivatives.

Résumé

L'auteur montre qu'il est possible de caractériser à l'échelle du microgramme les di et trihydroxybenzènes et les acides aromatiques hydroxylés par formation de matières colorantes caractéristiques lors d'essais à la touche effectués en employant neuf sels stables de diazonium.

La sensibilité de l'identification des hydroxybenzènes et des acides hydroxybenzène carboxyliques est si élevée qu'elle permet par un essai à la touche de mettre en évidence l'apparition de ces composés comme produits de dégradation lors de la fusion alcaline de dérivés de l'hydroxyphénylbenzo-γ-pyrone.

On a déterminé par essai à la touche le comportement de 28 flavones lors de leurs réactions sur les 3 sels stables de diazonium suivants: le 4-amino-3,6-diméthoxy-4′-nitroazobenzène diazoté; le 1-amino-4-benzoylamido-2,5-diéthoxybenzène diazoté et la diorthoanisidine tétraazotée; on a établi simultanément les limites de sensibilité correspondantes à la lumière du jour et à la lumière ultraviolette. Les essais à la touche ont également permis la différenciation des flavonoaglucones des flavonoglucosides en employant le 4-amino-3,6-dimethoxy-4′-nitroazobenzène diazoté comme réactif; de même qu'en chromatographie sur papier, il se forme une matière colorante soit jaune, soit bleue suivant la constitution des dérivés de l'hydroxyphénylbenzo-γ-pyrone.

Literatur

[1] *R. Neu*, Z. analyt. Chem. **151**, 321 (1956).

[2] *R. Neu*, Z. analyt. Chem. **153**, 184 (1956).

[3] *R. Robinson*, The Structural Relations of Natural Products. Oxford: Clarendon Press. 1955. S. 36.

[4] *R. Neu*, Z. analyt. Chem. im Druck.

[5] *R. J. Block, E. L. Durrum* und *G. Zweig*, A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis. New York: Academic Press. 1955. S. 230.

[6] *R. Neu*, Mikrochim. Acta [Wien] im Druck.

[7] *G. Lindstedt* und *A. Misiorny*, Acta Chem. Scand. **5**, 1 (1951).

[8] *W. Brune*, Observações químicas e bioquímicas sôbre flavonoides em Rutaceae. Viçosa (Brasilien): Benth. et Hook. 1956.

[9] *A. B. Kulkarni* und *I. R. Merchant*, J. Sci. Ind. Research **14 B**, 153 (1955).

[10] *E. C. Bate-Smith* und *T. Swain*, J. Chem. Soc. London **1953**, 2185.

[11] *T. Swain*, Biochem. J. **53**, 200 (1953).

[12] *J. Deshusses*, Trav. chim. alim. et hyg. **46**, 37 (1955).

[13] *J. A. Durant*, Nature **169**, 1062 (1952).

[14] *F. Feigl*, Spot Tests, Vol. II. Amsterdam: Elsevier. 1954. S. 134.

[15] *E. C. Bate-Smith*, Scient. Proc. Royal Dublin Soc. **27**, 165 (1956).

[16] *M. Nierenstein* und *A. Clibbens*, Organic Syntheses Collect. Vol. II, 557. New York: Wiley. 1955.

[17] *F. Klages*, Lehrbuch der organischen Chemie, Bd. I, 1. Hälfte. Berlin: W. de Gruyter. 1952. S. 490.

[18] *I. A. Pearl*, Organic Syntheses **30**, 101. New York: Wiley. 1950.

[19] *J. S. Buck*, Organic Syntheses Collect. Vol. II, 619 (1955).

[20] *A. Dobrowsky*, Mh. Chem. **86**, 325 (1955).

[21] *W. H. Perkin* jr. und *F. W. Stoyle*, J. Chem. Soc. London **123**, 3173, 3175 (1923).

[22] *G. O. Rudkin* und *J. M. Nelson*, J. Amer. Chem. Soc. **69**, 1470 (1947); *H. M. Barnes, J. R. Feldman* und *W. V. White*, J. Amer. Chem. Soc. **72**, 4178 (1950); *U. Fiedler*, Arzneimittel-Forsch. **4**, 41 (1954).

[23] *R. L. Hossfeld*, J. Amer. Chem. Soc. **73**, 852 (1951).

[24] *R. Neu*, Naturwiss. **43**, 82 (1956).

[25] *Z. Čekan* und *V. Herout*, Chem. Listy **49**, 1053 (1953).

[26] *P. Tunmann* und *O. Isaak*, Angew. Chem. **67**, 708 (1955).

Aus dem Anorganisch-chemischen Institut der Universität Göttingen

Die photometrische Mikrobestimmung des Eisens mit Ferron und Tributylammoniumsalz

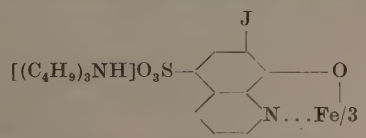
Von

Max Ziegler, Oskar Glemser und **Norbert Petri***

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 8. Oktober 1956)

Vor kurzem wurde über die photometrische Bestimmung des Eisens mit Ferron (7-Jod-8-Hydroxychinolin-5-Sulfosäure) und Tributylammoniumacetat berichtet[1]. Die bei der Reaktion von Eisen(III)-salz mit den Reagenzien gebildete grüne Verbindung von der Formel



ist in Wasser löslich, kann aber mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln extrahiert werden.

Iso-Amylalkohol eignet sich hierzu gut wegen seiner geringen Flüchtigkeit und des günstigen Verteilungskoeffizienten des Reaktionsproduktes zwischen nichtwäßriger und wäßriger Phase. Ferron reagiert nicht allein mit Fe^{3+}-Ionen, sondern auch mit anderen Ionen von Übergangsmetallen z. B. mit Al^{3+}, Zn^{2+}, Ni^{2+} oder Cu^{2+}. Die Reaktionsprodukte der beiden erstgenannten Ionen zeigen mit Ferron allein zwar keine störenden Färbungen, jedoch verursachen sie einen so hohen Verbrauch an Ferron, daß bei der Ausführung der Reaktion ohne Extraktion beträchtliche Fehler auftreten und nur geringe Spezifitäten zu erreichen sind.

Im Absorptionsspektrum der Eisen(III)-verbindung (Abb. 1) in Amylalkohol treten drei deutliche Extinktionsmaxima auf, von denen nur das

* Teil der Diplomarbeit, Göttingen 1956.

bei 610 mμ brauchbar ist, weil auch das gelb gefärbte Reagens mit Amylalkohol extrahiert wird und nur bei 610 mμ keine nennenswerte Störung verursacht.

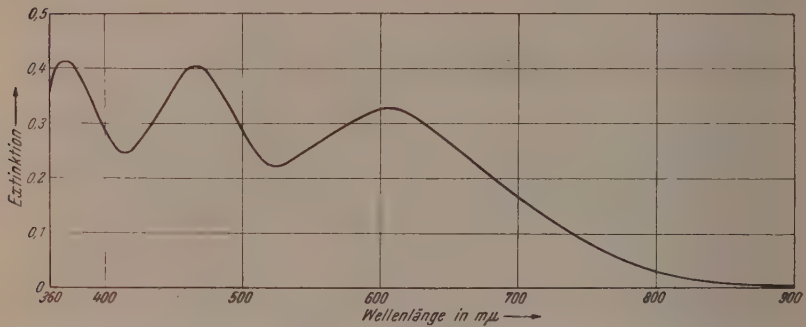


Abb. 1. Das Spektrum des Tributylammonium-Ferron-Eisen(III)-Komplexes in Isoamylalkohol

Die Abhängigkeit der Reaktion vom p_H-Wert der Lösung ist verhältnismäßig gering. Die p_H-Extinktionskurve (Abb. 2) weist zwischen $p_H = 2$ und 7,5 Geradlinigkeit auf.

Die bei der makro-photometrischen Bestimmung des Eisens gemachten Erfahrungen erlauben nun die Anwendung des Verfahrens auch zur Bestimmung von Eisenmengen von nur 0,1 μg Fe^{3+}/15 ml.

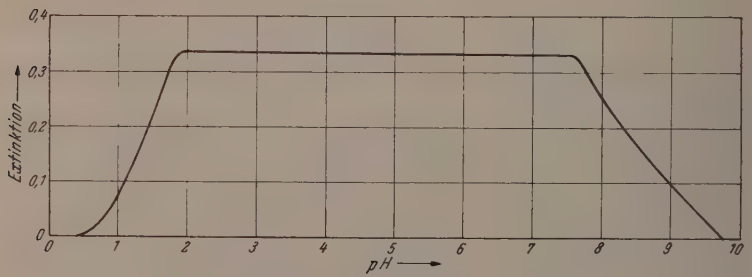


Abb. 2. Die Abhängigkeit der Extinktion vom p_H-Wert

In der vorliegenden Arbeit benutzten wir das lichtelektrische Kompensationsphotometer der Firma Ernst Leitz, Wetzlar, mit dem Filter 600 und verwendeten Küvetten von 1 ml Fassungsvermögen und 50 mm Schichtlänge, die wir bereits bei der Mikrobestimmung des Kobalts beschrieben haben[2].

Zur Aufstellung der Eichkurve wird eine Eisen(III)-chloridlösung bekannten Fe-Gehaltes benutzt. Wie Abb. 3 zeigt, ist das *Lambert-Beer*sche Gesetz unter den nachstehenden Arbeitsbedingungen im Mikrobereich erfüllt.

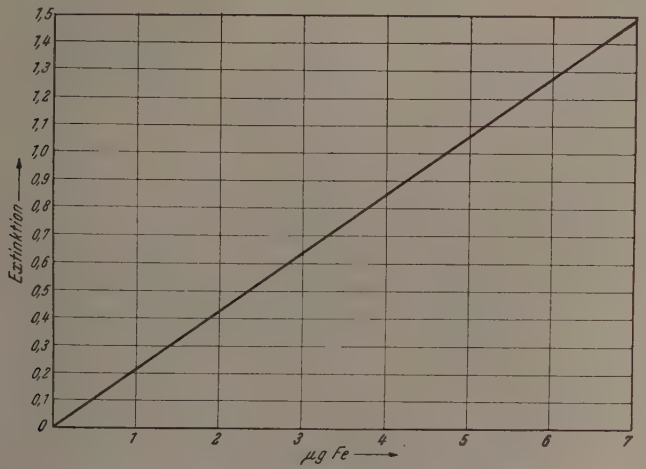


Abb. 3. Eichkurve für die Mikrobestimmung des Eisens

Reagenzien:

1. Pufferlösung $p_H = 4{,}3$: 200 ml Eisessig, 250 g Natriumacetat mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.
2. Ferronlösung: 0,025%ig.
3. Ferron-Natrium-Lösung: 2,0%ig.
4. Tributylammoniumacetat: Mit Aktivkohle gereinigtes Tri-n-butylamin wird mit Eisessig neutralisiert. Nach Zufügen eines Aminüberschusses und gutem Durchschütteln benutzt man die untere Acetatphase als Reagens.
5. Iso-Amylalkohol reinst bzw. redestilliert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift

10 bis 12 ml der nicht zu stark sauren Probelösung werden in einem Schütteltrichter mit kurzem Ablaufrohr von etwa 25 ml Inhalt mit 1 ml Pufferlösung, 1 ml Ferronlösung und 0,1 ml Tributylammoniumacetat vermischt. Nach Zusatz von 1,5 ml Iso-Amylalkohol schüttelt man mit etwa 20 Schüttelschlägen kräftig durch und läßt 15 bis 20 Minuten lang absitzen. Nach dieser Zeit trennt man die wäßrige Phase möglichst vollständig ab und sorgt dann durch Drehen und Wenden des Schüttel-

trichters für die Sammlung der noch im Trichter verbliebenen wäßrigen Phase, die man hierauf vollständig ablaufen läßt. Anschließend trocknet man das Ablaufrohr innen mit einem Glasstab mit Wattebausch. Den Alkohol gießt man in ein Meßkölbchen von 2 ml Inhalt und spült den Trichter mit 0,5 ml Amylalkohol nach. Sind die ersten 1,5 ml Amylalkohol trüb, so tritt meist bei Zusatz der restlichen 0,5 ml vollständige Klärung ein, andernfalls filtriert man durch ein kleines Wattefilter.

Nach diesem Verfahren wurde die Eichkurve aufgenommen. Neben und in Alkali- und Erdalkalisalzen ist Eisen auf diese Weise bestimmbar, sowie ebenfalls neben Alkaliphosphaten und Cr^{3-}-Ionen.

Bei Anwesenheit größerer Mengen anderer Ionen der Übergangsmetalle muß entweder zweimal extrahiert oder auch mit größeren Mengen Ferron (2%ige Ferron-Natrium-Lösung) gearbeitet werden, wie im folgenden für jedes Element dargelegt wird. Es ist bei einer möglichen Anwesenheit größerer Mengen solcher Ionen alsbald die Arbeitsweise zu wählen, die beim Vorliegen großer Aluminiummengen benutzt wird. Beim Vorliegen größerer Mengen Cu^{2-} oder Ni^{2-} sind spezielle Maskierungen mit KCN notwendig.

Die Bestimmung des Eisens neben größeren Mengen von Fremdionen:

1. *Phosphorsäure:* Nach obiger Vorschrift für 2 μg Fe^{3-} neben 1 g PO_4^{3-}, gefundene Extinktion: 0,463; theoretische Extinktion: 0,46.

2. *Calcium:* Nach obiger Vorschrift für 2 μg Fe^{3-} neben 1 g Ca^{2-}, gefundene Extinktion: 0,467; Extinktion nach Eichkurve: 0,46.

3. *Mangan:* für 2 μg Fe^{3-} neben 1 g Mn^{2-}, gefundene Extinktion: 0,458; Extinktion gemäß Eichkurve: 0,46.

Es muß zweimal mit je 1 ml Amylalkohol extrahiert werden, da sonst Minusfehler auftreten. Im übrigen arbeitet man so, wie unter der allgemeinen Arbeitsvorschrift angegeben ist.

4. *Chrom* (als $CrCl_3$): Es kann unverändert nach der allgemeinen Vorschrift gearbeitet werden, wie aus folgendem zu ersehen ist:

mg Cr^{3-}	Gegebene Fe^{3-}-Menge (μg)	Extinktion		Theoretische Extinktion gemäß Eichkurve
		gemessen	reduziert	
10	—	0,439	—	—
10	1,0	0,662	0,223	0,21
10	2,0	0,870	0,431	0,42
10	3,0	1,090	0,651	0,63

Das benutzte $CrCl_3$ enthielt Eisen, so daß dessen „Blindwert" von den gemessenen Werten abgezogen werden mußte (reduzierte Extinktionen).

5. *Aluminium:* Al^{3-}-Ionen verbrauchen Reagens und wirken daher auch bleichend auf die entstehende Eisenfärbung. Deshalb wird hier

mit 2%iger Ferron-Natrium-Lösung, also mit großem Reagensüberschuß, gearbeitet. Man stellt den p_H-Wert der Probelösung durch Zusatz von festem Natriumacetat auf ~ 4.5 ein, setzt 1 ml Ferron-Natrium-Lösung sowie 0,1 ml Tributylammoniumacetat zu und mischt gut durch. Es wird zweimal mit je 1 ml Iso-Amylalkohol ausgeschüttelt. Als Aluminium wurde Al-Band von 99.99% (Merck) benutzt. Der Eisengehalt dieses Materials wurde von den jeweils gemessenen Extinktionen abgesetzt (reduzierte Extinktionen). Bei der Messung wird gegen die Ausschüttelung aus einem Blindansatz der Reagenzien kompensiert.

mg Al^{3+}	Gegebene Fe^{3+}-Menge (µg)	Extinktion		Theoretische Extinktion gemäß Eichkurve
		gemessen	reduziert	
100	—	0,477	—	—
100	0,5	0,582	0,105	0,105
100	1,0	0,691	0,214	0,21
100	2,0	0,883	0,406	0,42
100	3,0	1,132	0,655	0,63
100	4,0	1,322	0,845	0,84

Bei der Untersuchung von 50 mg Aluminium(legierung) genügt eine Reagensmenge von 0.5 ml 2%iger Ferron-Natrium-Lösung.

Man benötigt, wie aus den oben angeführten Extinktionswerten hervorgeht, zur Bestimmung eines Eisengehaltes von 0.5% nur 0.1 mg Material, was für die Homogenitätsprüfung von Legierungen wichtig sein kann.

6. *Zink:* Es verbraucht auch Reagens, jedoch in schwächerem Maße als Aluminiumsalz; deshalb muß mehr Ferron benutzt werden. Man stellt mit 1 ml Pufferlösung den p_H-Wert ein und vermischt mit 1 ml 0.2%iger Ferronlösung und 0.1 ml Tributylammoniumacetat. Es wird zweimal mit je 1 ml Iso-Amylalkohol extrahiert. Als Zinkmaterial wurde $ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$ benutzt, das auch Eisen enthielt.

mg Zn^{2+}	Gegebene Fe^{3+}-Menge (µg)	Extinktion		Theoretische Extinktion gemäß Eichkurve
		gemessen	reduziert	
200	—	0,239	—	—
200	1,0	0,450	0,211	0,21
200	2,0	0,653	0,414	0,42
200	3,0	0,877	0,638	0,63

7. *Nickel:* Ni^{2+}-Ionen liefern mit dem Reagens störende Grünfärbungen. Deshalb muß mit Maskierungsmitteln gearbeitet werden. Am besten eignet sich dazu Kaliumcyanid.

Arbeitsvorschrift a): Die Probelösung, die bis 35 mg Ni enthalten kann, wird mit 1 ml Pufferlösung und 0,5 ml Ferron-Natrium-Lösung (2%ig) vermischt. Hiernach setzt man 2 ml Pufferlösung sowie 2 ml KCN-Lösung (20%ig) hinzu und schüttelt um. Nach dem Zufügen von 0,1 ml Tributylammoniumacetat extrahiert man erst mit 1 ml und danach nochmals mit 0,75 ml Amylalkohol.

Folgende Beleganalysen zeigen die Brauchbarkeit dieses Verfahrens:

mg Ni^{2+}	Gegebene Fe^{3+}-Menge (μg)	Extinktion		Theoretische Extinktion gemäß Eichkurve
		gemessen	reduziert	
35	—	0,205*	—	—
35	1,0	0,556	0,205	0,21
35	2,0	0,762	0,411	0,42
35	3,0	0,985	0,634	0,63

* Diese Färbung rührt vom extrahierten Ferron-Tributylammonium bzw. Eisen(III)-salz her und ist durch eine Kompensationsmessung zu eliminieren (Blindansatz mit den Reagenzien).

8. *Kupfer:* Cu^{2+}-Ionen haben eine ganz ähnliche Wirkung wie Ni^{2+}-Ionen. Ihre Maskierung erfolgt ebenfalls mit Kaliumcyanid.

Arbeitsvorschrift b): Die nicht zu stark saure Probelösung, die bis 0,5 mg Cu enthalten darf, wird der Reihenfolge nach mit folgenden Zusätzen vermischt: 1 ml Pufferlösung, 0,2 ml Ferron-Natrium-Lösung (2%ig), 2 ml Pufferlösung, 2 ml Kaliumcyanidlösung (20%ig), 0,1 ml Tributylammoniumacetat. Es wird erst mit 1 ml Amylalkohol und nach dessen Abtrennung mit 0,75 ml ein zweites Mal extrahiert. Die Anwendbarkeit dieser Methode geht aus folgenden Beleganalysen hervor:

mg Cu^{2+}	Gegebene Fe^{3+}-Menge (μg)	Extinktion		Theoretische Extinktion gemäß Eichkurve
		gemessen	reduziert	
0,5	—	0,248*	—	—
0,5	1	0,456	0,208	0,21
0,5	2	0,656	0,408	0,42
0,5	3	0,871	0,623	0,63

* Diese Färbung rührt von extrahiertem Reagens und dem Fe-Gehalt der benützten Kupfersalzlösung her und ist durch einen Kompensationsblindansatz mit den Reagenzien zu eliminieren.

9. *Kobalt:* Co^{2+}-Ionen binden nur wenig Reagens. Man arbeitet bei Co-Mengen bis 50 mg mit 1 ml Pufferlösung, 0,5 ml Ferron-Natrium-Lösung (2%ig) und 0,1 ml Tributylammoniumacetat; bei Co^{2+}-Mengen bis 25 mg genügt 1 ml Ferronlösung (0,2%ig) und bei Co^{2+}-Mengen bis 2,5 mg reichen 2 ml Ferronlösung (0,025%ig) aus.

mg Co^{2+}	Gegebene Fe^{3+}-Menge (μg)	Extinktion		Theoretische Extinktion gemäß Eichkurve
		gemessen	reduziert	
50	—	0,290*	—	—
50	1	0,507	0,217	0,21
50	2	0,702	0,412	0,42
50	3	0,919	0,629	0,63
50	4	1,127	0,837	0,84

* Durch Kompensationsblindansatz mit den Reagenzien zu eliminieren.

10. *Blei:* Pb^{2+}-Ionen verbrauchen noch weniger Reagens als Co^{2+}-Ionen. Für Pb-Mengen bis 500 mg sind folgende Zusätze zu wählen: 1 ml Pufferlösung, 3 ml Ferronlösung (0,05%ig), 0,1 ml Tributylammoniumacetat. Man extrahiert zweimal mit je 1 ml Iso-Amylalkohol.

mg Pb^{2+}	Gegebene Fe^{3+}-Menge (μg)	Extinktion		Theoretische Extinktion gemäß Eichkurve
		gemessen	reduziert	
500	—	0,224	—	—
500	1,0	0,434	0,21	0,21
500	2,0	0,638	0,414	0,42
500	3,0	0,852	0,628	0,63
500	4,0	1,061	0,837	0,84

Bei Pb^{2+}-Mengen bis 100 mg genügen 2 ml Ferronlösung (0,025%ig), um eine quantitative Umsetzung zu erzielen. Zusatz größerer Mengen von Ferron als angegeben bzw. von Ferron-Natrium, verursachen die Ausfällung eines weißen Niederschlages.

11. *Cadmium:* Cd^{2+}-Ionen binden Ferron nur in ganz geringem Maße, so daß bis zu Mengen von 20 mg Cd 2 ml 0,05%iger Ferronlösung zur Eisenbestimmung genügen.

Bis zu 500 mg Cd benötigen folgende Zusätze: 1 ml Pufferlösung, 5 ml Ferronlösung (0,2%ig) und 0,1 ml Tributylammoniumacetat. Größere Ferronüberschüsse (insbesondere als Ferron-Natrium) verursachen die Fällung graugrüner Niederschläge, die an der Phasengrenze angereichert werden und deshalb stören.

mg Cd^{2+}	Gegebene Fe^{3+}-Menge (μg)	Extinktion		Theoretische Extinktion gemäß Eichkurve
		gefunden	reduziert	
500	—	0,417	—	—
500	1	0,626	0,209	0,21
500	2	0,835	0,418	0,42
500	3	1,005	0,638	0,63

12. *Zinn:* Sn^{4+}-Ionen müssen mittels Natriumcitrat maskiert werden. Für Zinnmengen bis zu 30 mg benutzt man folgende Zusätze: 0,8 ml 40%ige Natriumcitratlösung, 1 ml Pufferlösung, 1,5 ml Ferron-Natrium-Lösung (2%ig), 0,1 ml Tributylammoniumacetat. Die so erhaltenen Werte sind folgende:

mg Sn^{4+}	Gegebene Fe^{3+}-Menge (μg)	Extinktion		Theoretische Extinktion gemäß Eichkurve
		gefunden	reduziert	
30	—	0,382	—	—
30	1,0	0,591	0,209	0,21
30	2,0	0,803	0,421	0,42
30	3,0	1,000	0,618	0,63

13. *Antimon:* Ebenso wie bei Gegenwart von viel Sn^{4+} muß auch bei Anwesenheit von Sb^{3+}-Ionen Alkalicitrat zugefügt werden, um die Hydrolyse zu vermeiden.

Ansatz für 100 mg Sb^{3+}: 2 ml 40%ige Natriumcitratlösung, 1 ml Pufferlösung, 1 ml Ferron-Natrium-Lösung (2%ig), 0,1 ml Tributylammoniumacetat.

mg Sb^{3+}	Gegebene Fe^{3+}-Menge (μg)	Extinktion		Theoretische Extinktion gemäß Eichkurve
		gefunden	reduziert	
100	—	0,564	—	—
100	1,0	0,786	0,224	0,21
100	2,0	0,984	0,420	0,42
100	3,0	1,213	0,649	0,63
30 mg SiO_2	—	0,424	—	—
30 mg SiO_2	2,0	0,845	0,421	0,42

Bei Sb^{3+}-Mengen bis 4 mg genügen 0,2 ml 40%ige Natriumcitratlösung und 1,5 ml 0,2%ige Ferronlösung.

14. *Kieselsäure:* Als Natron-Wasserglas vorliegende Kieselsäure beeinträchtigt die Eisenbestimmung erst ab etwa 40 mg SiO_2/15 ml durch Gelbildung, die die Phasentrennung erschwert.

Bei dem Verhältnis $Fe : SiO_2 = 1 : 20000$ ist die Eisenbestimmung gut durchführbar.

Die Brauchbarkeit des Verfahrens

Der Vergleich der erreichten Spezifitäten mit denen anderer Bestimmungsmethoden für Eisen ergibt sich aus folgender Übersicht der

Grenzverhältnisse, bei denen sich 1 μg Fe^{3+} mit einem Fehler von $\pm$ 2% bestimmen läßt*:

Fe^{3+}	: Cu^{2+}	= 1 : 500
„	: Cr^{3+}	= 1 : 10000
„	: SiO_2	= 1 : 20000
„	: Sn^{4+}	= 1 : 30000
„	: Ni^{2+}	= 1 : 35000
„	: Co^{2+}	= 1 : 50000
„	: Sb^{3+}	= 1 : 100000
„	: Al^{3+}	= 1 : 200000
„	: Zn^{2+}	= 1 : 200000
„	: Ca^{2+}	= 1 : 500000
„	: Pb^{2+}	= 1 : 500000
„	: Mn^{2+}	= 1 : 500000
„	: Cd^{2-}	= 1 : 500000

Vergleichsweise gelten für die Bestimmung des Eisens mit o-Phenanthrolin die Grenzverhältnisse:

Fe^{3+}	: Ni^{2+}	= 1 : 5
„	: Co^{2+}	= 1 : 5
„	: Cu^{2+}	= 1 : 5
„	: Cr^{3+}	= 1 : 10
„	: Al^{3+}	= 1 : 250
„	: Sb^{3+}	= 1 : 50
„	: Cd^{2+}	= 1 : 100

Größere Mengen von Bi^{3+}, Zn^{2+} sowie Ag^{+}-Ionen fällen das Reagens.

Die Reaktion des α,α'-Dipyridyls oder α,α',α''-Tripyridyls mit Eisen-(III)-salz wird unter anderem durch Ni^{2+}- und Mn^{2+}-Ionen (Braunfärbung) empfindlich gestört. PO_4^{3-}-Ionen verlangsamen die Reaktion so stark, daß eine längere Wartezeit notwendig wird.

Dagegen verläuft die Reaktion von Fe^{3+}-Ionen mit Ferron und Tributylammoniumsalz auch neben großen Mengen PO_4^{3-} sofort und erreicht neben Ni^{2+} oder Mn^{2+} eine große Spezifität.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemie und der Firma Ernst Leitz, Optische Werke, Wetzlar, danken wir für Unterstützung.

Zusammenfassung

Es wird über ein schnell ausführbares photometrisches Verfahren berichtet, das die Bestimmung von 0,1 μg Eisen ermöglicht. Die Meßgenauigkeit wird auch durch einen 500000fachen Überschuß an anderen Übergangsmetallen nicht beeinträchtigt. Das Verfahren erlaubt die

* In den meisten Fällen lassen sich auch 0,2 μg Eisen bei den genannten Grenzverhältnissen bestimmen.

Reinheitsprüfung zahlreicher Salze, insbesondere auch der Alkaliphosphate. Zur Fe-Bestimmung in Reinaluminium wird nur 0,1 mg Material benötigt.

Summary

A report is given of a rapid photometric procedure for the determination of 0.1 μg of iron. The accuracy is not impaired even by a 500 000 times excess of other transition elements. The procedure can be used for testing the purity of numerous salts, particularly also alkali phosphates. Only 0.1 mg of material is needed for determining iron in pure aluminium.

Résumé

Description d'une technique photométrique rapide permettant le dosage de quantités de fer de l'ordre de grandeur de 0,1 μg.

La précision de la mesure n'est pas influencée par la présence d'une quantité 500 000 fois plus élevée d'autres métaux de transition. Cette technique permet de contrôler la pureté de nombreux sels, en particulier de phosphates alcalins. Pour doser le fer dans l'aluminium pur elle ne nécessite que 0,1 mg de substance.

Literatur

[1] *M. Ziegler, O. Glemser* und *N. Petri*, Z. analyt. Chem. **154**, 170 (1954).
[2] *M. Ziegler, O. Glemser* und *E. Preisler*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 1526.

Aus dem Laboratorium für analytische Chemie, Ecole de Chimie, Universität Genf

Ein einfacher Druckregler für die Mikro-C-H-Analyse

(Kurze Mitteilung)

Von

Kurt Eder

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 13. Dezember 1956)

Bei der von *Pregl*[1] entwickelten Apparatur zur Bestimmung des Kohlenstoffes und Wasserstoffes wird zur Aufrechterhaltung eines konstanten Druckes zwischen die Gasometer und das U-Rohr ein Druckregler eingeschaltet, dessen glockenförmiger Teil verschiebbar gehalten wurde. Dies erforderte die Verwendung längerer Schlauchverbindungen, die einer gewissen Vorbehandlung bedürfen, damit sie kein sogenanntes „Schlauchgas" abgeben, und die immer eine mögliche Fehlerquelle

bedeuten. Um solche lange Schlauchverbindungen zu vermeiden, hat *Roth*[2] den Druckregler modifiziert, indem er die Glocken durch kurze Schlauchstücke mit den Zu- und Ableitungsrohren Glas an Glas verbindet und die Glaszylinder (Standgefäße) verschiebbar anordnet.

Man kann nun auch Gasometerglocke und Standgefäß fixiert halten, wenn man das Standgefäß am Boden mit einem Seitenarm von etwa 2 cm Durchmesser und etwa 14 cm Länge versieht.

Durch diesen seitlichen Schenkel läßt sich durch Zugabe oder Wegnahme von Wasser mit einer Pipette der gewünschte Druck einstellen. Den gleichen Effekt erzielt man auch durch Verwendung eines verschiebbaren Tauchkörpers (Reagensglas) im seitlichen Rohr, wobei dessen Fixierung durch einen Korkstopfen erfolgt.

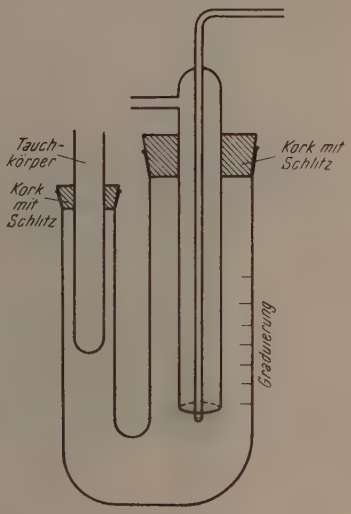


Abb. 1

Ferner hat sich die Anbringung einer willkürlichen Graduierung am Standgefäß als vorteilhaft erwiesen, um die einmal eingestellte Druckhöhe leichter kontrollieren zu können.

Man kann, auch wenn man mit Sauerstoff aus einer Bombe und mit Luft aus einem Gasometer arbeitet, mit nur einem Druckregler auskommen, wenn man einen Dreiweghahn vor den Druckregler setzt und zwischen die Sauerstoffbombe und den Druckregler einen zweiten Dreiweghahn anbringt, damit man den Sauerstoffdruck von der Bombe her aufheben kann. In diesem Fall ist es vorteilhaft, auch zwischen Blasenzähler und Druckregler einen einfachen Glashahn einzuschalten, damit man bei Nichtgebrauch der Apparatur den Blasenzähler von der feuchten Luft im Druckregler abschließen kann, was sich in jedem Falle empfiehlt.

Literatur

[1] *F. Pregl,* Die quantitative organische Mikroanalyse. 4. Aufl. Berlin: J. Springer. 1935. S. 23.

[2] *H. Roth,* Mikrochem. Molisch-Festschrift 373 (1936).

Aus dem Laboratorium für analytische Chemie, Ecole de Chimie, Universität Genf

Füllvorrichtung für einfache Mikrobüretten

(Kurze Mitteilung)

Von

Kurt Eder

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 13. Dezember 1956)

Zahlreiche mikroanalytische Bestimmungen lassen sich heute titrimetrisch durchführen. Die hiezu verwendeten Büretten, meist mit 10 ml Fassungsvermögen, kommen in verschiedenen Ausführungen auf den Markt; die bevorzugte Form besitzt eine automatische Nullpunktseinstellung und ist auf das Standgefäß aufgeschliffen. Wenn man für alle Titriermethoden derartige Büretten verwenden will, braucht man eine ganze Anzahl davon. Diese Büretten sind nicht billig und daher für seltener durchgeführte Titrationen unrentabel. Einfachere Typen mit angeschmolzenem seitlichem Füllrohr und Reservegefäß haben den Nachteil, daß beim Füllen meistens Luftblasen im Füllrohr und Bürettenrohr, besonders am Glashahn auftreten, die oft schwer zu entfernen sind. Außerdem läßt sich hierbei die Auslaufspitze nie mit der Lösung füllen und auch hier treten sehr oft lästige Luftblasen auf.

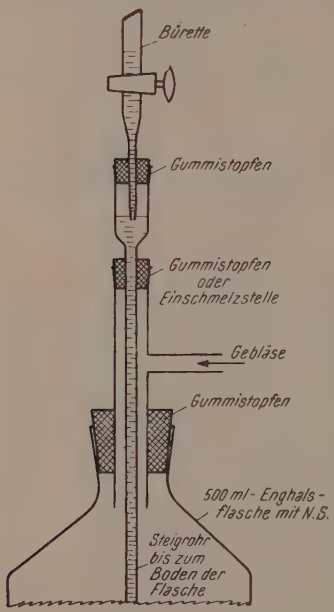


Abb. 1

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde eine kleine Füllvorrichtung für einfache Mikrobüretten konstruiert, die sich sehr gut bewährt hat (Abb. 1).

Die Art der Handhabung folgt ohne weiteres aus der Zeichnung. Die Normallösungen werden in Flaschen mit ungefähr gleich weitem Flaschenhals, z. B. 500-ml-Flaschen mit Normalschliffstopfen, aufbewahrt. Zum Füllen wird die Bürettenspitze bei offenem Bürettenhahn luftdicht in den oberen

Gummistopfen eingesetzt. Mit einem Gummigebläse mit zwischengeschaltetem T-Stück, das beim Hinaufdrücken der Lösung mit einem Finger verschlossen gehalten wird, wird die Lösung in die Bürette gedrückt, worauf der Bürettenhahn geschlossen wird. Das T-Stück erlaubt die Regulierung des Druckes und zum Schluß ein Aufheben des Überdruckes in der Flasche. Selbstverständlich läßt sich die Lösung auch vom offenen Ende der Bürette aus aufsaugen. Zwischen T-Stück und seitlichem Ansatz des Füllgerätes wird ein kleines Rohr mit Natronkalk oder einem anderen Reinigungsmittel eingeschaltet. Es ist sehr darauf zu achten, daß die Bürettenspitze luftdicht im Gummistopfen sitzt, damit die Lösung nicht mit dem Gummi in Berührung kommt.

Das kleine Füllgerät und auch die einfachen Mikrobüretten sind leicht zu reinigen und zu trocknen, wodurch ein rasches Umstellen auf andere Maßlösungen ermöglicht wird.

Aus dem Laboratorium für analytische Chemie, Ecole de Chimie, Universität Genf

Über eine Hilfseinrichtung für die Mikro-Kjeldahl-Stickstoff-Bestimmung

(Kurze Mitteilung)

Von

Kurt Eder

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 28. Dezember 1956)

Die Überführung der mit Schwefelsäure aufgeschlossenen und mit Wasser verdünnten Substanz aus dem Zersetzungskölbchen in den Destillationsapparat durch Eingießen in den kleinen Einfülltrichter ist eine etwas heikle Prozedur, da man aufpassen muß, daß keine Lösung an der äußeren Wand des Zersetzungskölbchens zurückläuft und dadurch verlorengeht. Die Überführung läßt sich wesentlich einfacher gestalten, wenn man die Lösung aus dem Zersetzungskölbchen mit einem Heberarm, der seitlich am Einfülltrichter angesetzt ist, in den Destillationsapparat übersaugt (Abb. 1). Das Ansaugen geschieht vom Kühlerende aus mit Hilfe eines Reagensglases mit Seitenarm, das mit einem Gummistopfen möglichst hoch am Kühlerrohr befestigt wird. Der Gummistopfen verbleibt am Kühler und soll so hoch sitzen, daß er das Titrierkölbchen in keiner Weise behindert. Der Seitenarm des Reagensglases wird mit einem Gummischlauch versehen, mit dem die Lösung angesaugt wird

(Abb. 2). Das übergestülpte Reagensglas verhindert eine Verunreinigung des Kühlerendes.

Selbstverständlich läßt sich an Stelle des Gummistopfens auch eine Schliffvorrichtung verwenden, wobei der Schliff aber durch Federn gesichert werden muß. Als weitere kleine Abänderung ist die Anbringung eines Quetschhahnes zwischen Rezipient und Destillierkolben erforderlich. Während des Übersaugens der Lösung muß dieser Quetschhahn geschlossen gehalten werden. Zum Befestigen des Zersetzungskölbchens hat sich die in Abb. 3 skizzierte Vorrichtung bestens bewährt. Der untere Ring, der das Kölbchen trägt, ist horizontal drehbar.

Abb. 1

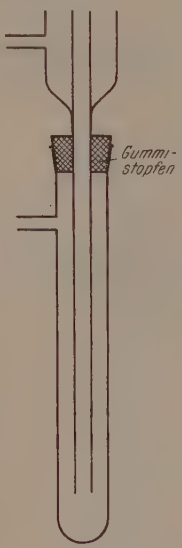


Abb. 2

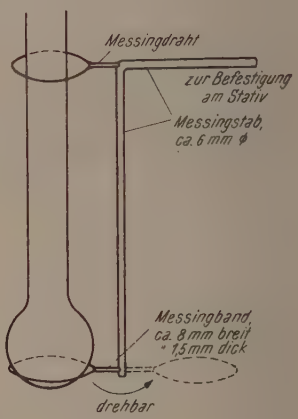


Abb. 3

Prozedur: Der erkaltete Inhalt des Zersetzungskölbchens wird mit 2 bis 3 ml Wasser verdünnt und gekühlt. Der Quetschhahn zwischen Rezipient und Destillierkolben wird geschlossen und der Ablaßhahn des Rezipienten offen gehalten, damit der Dampf entweichen kann. Der weite Teil des Einfülltrichters wird mit einem einwandfreien Kork- oder Gummistopfen verschlossen und das Ansaugrohr am Kühlerende befestigt. Der untere Ring des Kölbchenhalters wird zur Seite gedreht, das Zersetzungskölbchen durch den oberen Ring über das Heberrohr geschoben und der untere Ring wieder in Position gebracht. Das Kölbchen ruht nun auf dem unteren Ring und wird durch den oberen Ring in senkrechter

Stellung gehalten. Die Haltevorrichtung für das Kölbchen ist so befestigt, daß das Ende des Hebers sich 1 bis 2 cm über der Flüssigkeit befindet. Die linke Hand hebt nun das Kölbchen auf, bis das Heberrohr den Boden berührt. Mit der rechten Hand bedient man den Schlauch der Saugvorrichtung. Durch leichtes Saugen mit dem Mund wird nun der Inhalt des Kölbchens übergesaugt. Nach Absetzen auf den Ring wird das Kölbchen unter Drehen mit 1 bis 2 ml Wasser ausgewaschen und das Waschwasser abgesaugt. Dies wird noch zwei- bis dreimal wiederholt, wobei man auch den Heber abspritzt. Das Kölbchen und die Ansaugevorrichtung werden nun entfernt, die Kalilauge wie üblich durch den Trichter nachgegossen und der Trichter mit wenig Wasser nachgewaschen. Während der Destillation kann man bereits das nächste Kölbchen in den Halter einsetzen.

Prof. Dr. Julius Donau — 80 Jahre

Am 1. März 1957 vollendet *Julius Donau* sein 80. Lebensjahr. Eine eingehende Würdigung des Lebenswerkes des weit über die Grenzen seines Vaterlandes bekannten Jubilars erschien schon vor 10 Jahren in dieser Zeitschrift, so daß es sich erübrigt, auf Einzelheiten seiner hervorragenden und bedeutsamen Leistungen einzugehen. Seine hohe Kunst des Experimentierens, sein Ideenreichtum und sein überragender Fleiß haben das Lebenswerk *Emichs* und *Pregls* vielfach befruchtet, zu dessen Weiterentwicklung beigetragen, und führten neben anderen Ehrungen im Jahre 1942 zu der Verleihung des *Fritz Pregl-Preises* durch die Österreichische Akademie der Wissenschaften an *Julius Donau*. Neben der Mikrochemie war *Donau* auch in besonderer Weise auf dem Gebiet der Kolloidchemie tätig, deren Entwicklung zu einem eigenen Fachgebiet in die Zeit seiner Assistentenjahre fiel.

Die Österreichische Gesellschaft für Mikrochemie, die Professor *Donau* seit Jahren mit Stolz zu ihren Ehrenmitgliedern zählt, nimmt den Anlaß seines Jubiläums mit Freuden wahr, ihm in aufrichtiger Verehrung ihre besten Glückwünsche darzubringen.

H. Lieb
G. Gorbach
M. K. Zacherl

Mitteilungen aus chemischen Gesellschaften

Das VII. Colloquium Spectroscopicum Internationale

findet in der zweiten September-Woche 1958 in Lüttich (Belgien) statt. Es wird durch die Vereinigung der Ingenieure der Universität Lüttich (A. I. Lg.) unter dem Vorsitz des Herrn Professor *L. D'Or* organisiert.

Anschrift des Verwaltungssekretariats:

VII. Colloquium Spectroscopicum Internationale,
Association des Ingénieurs de l'Université de Liége (A. I. Lg.)
22, rue Forgeur,
Liége, Belgique.

Note to Authors

Joint Committee on Chemical Analysis by Powder Diffraction Methods

of the *American Crystallographic Association*,
the *American Society for Testing Materials*,
the *British Institute of Physics*,
and the *National Association of Corrosion Engineers*

ersucht im folgenden, Daten betreffend Röntgenuntersuchungen nach der Pulvermethode, die nicht anderweitig veröffentlicht werden konnten, Herrn Dr. *G. W. Brindley* (Adresse siehe unten) mitzuteilen.

souhaite que les données résultant de recherches Röntgenographiques sur poudres qui ne pourraient être publiées par ailleurs soient communiquées à Monsieur le Docteur *G. W. Brindley* (voir ci-dessous).

When authors submit papers describing investigations in which X-ray powder measurements were made, but omitting the actual X-ray data, it is requested that these data be submitted to the Editor of the Joint Committee on Chemical Analysis by Powder Diffraction Methods for possible inclusion in the „X-ray Powder Data File", published by the A. S. T. M.

The data should contain accurate listings of „d" values and intensities of reflections. Other items of information of value for the data file are: hkl indices and lattice parameters if known, radiation used, type of X-ray recording employed, method of estimating intensities (visual, photometric, Geiger-counter), plus any relevant information concerning the nature and preparation of specimens studied.

G. W. Brindley
Editor, „X-ray Powder Data File",
College of Mineral Industries
The Pennsylvania State University
University Park, Pennsylvania. U. S. A.

The Society for Analytical Chemistry

Ordinary Meeting of the Midlands Section

An ordinary meeting of the Midlands Section of the Society for Analytical Chemistry was held on Thursday, January 10th, 1957, at 7 p. m. in the Mason Theatre, The University, Edmund Street, Birmingham, 3. The Chair was taken by the Vice-Chairman of the Section, Dr. *R. Belcher*, F. Inst. F., F. R. I. C.

The following paper was presented and discussed:

"*The Analytical Chemistry of Some Newer Insecticides and Herbicides*", by *K. Gardner*, B. Sc., F. R. I. C. (Chief Analytical Chemist, Fisons Pest Control Ltd., Cambridge).

The number of chemicals proposed for use as pesticides has increased very rapidly since the last war.

Apart from the complex problems associated with the analysis of pesticide residues on and in vegetable matter, the determination of the active ingredient content in the technical product is often made difficult by closely related impurities. A large majority of recently developed insecticides and herbicides is based on chlorinated hydrocarbons and organo-phosphorus compounds. The analytical chemistry of some of these technical materials was discussed. The compounds described included the insecticides demeton, dimefox, and malathion and the herbicides C. M. U. and sodium trichloroacetate.

Annual General Meeting of the Scottish Section

The Twenty-second Annual General Meeting of the Scottish Section of the Society for Analytical Chemistry was held at 1.30 p. m. on Thursday, January 17th, 1957, at the Rhul Restaurant, 123 Sauchiehall Street, Glasgow, under the Chairmanship of Dr. *F. J. Elliott*, M. Sc., F. R. I. C., F. R. S. E.

The following were elected Officers of the Section for the forthcoming year:

Chairman: Dr. *Magnus Pyke*, B. Sc., F. R. I. C.

Vice-Chairman: A. N. Harrow, Esq., A. H.-W. C., F. R. I. C.

Hon. Secretary & Treasurer: Mr. *J. A. Eggleston*, B. Sc., F. R. I. C., Boots Pure Drug Co. Ltd., Airdrie Works, Airdrie, Lanarkshire.

The Annual General Meeting was followed by two short talks by Dr. *F. J. Elliott*, M. Sc., F. R. I. C., F. R. S. E., and Dr. *Magnus Pyke*, B. Sc., F. R. I. C.

Annual General Meeting of Microchemistry Group

The Thirteenth Annual General Meeting of the Microchemistry Group of the Society for Analytical Chemistry was held at 6.45 p. m. on Friday, January 25th, 1957, in the Meeting Room of the Chemical Society, Burlington House, Piccadilly, London, W. 1. The Chair was taken by the Chairman of the Section, Dr. *G. F. Hodsman*, A. Inst. P.

The following were elected Officers of the Section for the forthcoming year:

Chairman: Mr. *D. F. Phillips*.

Vice-Chairman: Mr. *F. Holmes*.

Honorary Secretary: Mr. *D. W. Wilson*, Sir John Cass College, Jewry Street, Aldgate, London, E. C. 3.

Honorary Treasurer: Mr. *G. Ingram*.

The Annual General Meeting was followed by an Ordinary Meeting of the Society, organised by the Microchemistry Group.

Ordinary Meeting of the Society

An Ordinary Meeting of the Society, organised by the Microchemistry Group, was held at 7.15 p. m. on Friday, January 25th, 1957, in the Meeting Room of the Chemical Society, Burlington House, Piccadilly, London, W. 1. The Chair was taken by the President, Dr. *K. A. Williams*, F. R. I. C., A. Inst. P., M. Inst. Pet.

The subject of the Meeting was "Micro-volumetric Analysis" and the following papers were presented and discussed:

"Apparatus and Technique", by *D. W. Wilson*, M. Sc., F. R. I. C. (Department of Chemistry, Sir John Cass College, London, E. C. 3).

Some types of apparatus for the delivery and titration of small volumes of liquids were described. The manipulation accuracy, and the kinds of error to which they are subject were discussed.

"Primary Standards", by *R. Belcher*, Ph. D., D. Sc., F. R. I. C. (Department of Chemistry, University of Birmingham). Presented on his behalf by *J. H. Thompson*, Ph. D., B. Sc., A. R. I. C.

The requirements of a primary standard as laid down by *Dodge* in 1915 apply also for work on the micro-scale. Most important, however, is the necessity for the standard to have a high equivalent weight. Many of the primary standards which are used extensively in organic and inorganic microanalysis have been in use for many decades, but there is still room for further investigation concerning their reliability.

Some newer primary standards, which still await a co-operative investigation, appear to have desirable properties.

"End-point Location", by *E. Bishop*, B. Sc., A. R. T. C., A. R. I. C. (Department of Chemistry, University of Exeter).

The methods of locating the end-point of a titrimetric process were enumerated, and briefly examined. They included the use of principal and ancillary reagents (colour, adsorption, fluorescent and precipitation indicators) observed visually or photoelectrically; electrical methods such as potentiometry, amperometry and low and high frequency conductometry, together with miscellaneous technique based on the properties of electrode systems.

As the operating scale is progressively reduced, physical difficulties of observation of colour change, etc., or of accommodation of electrodes in the available solution volume, render the choice less and less wide. Some aspects of the problems arising in small scale working were mentioned, and the application of the differential electrolytic potentiometric technique to the ultramicro scale was briefly reported.

Buchbesprechungen

Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Band XIII. Herausgegeben von *L. Zechmeister*, Pasadena. Mit 48 Abb., XII, 624 S. Wien: Springer-Verlag. 1956. S 624,—, geb. S 645,—; DM 104,—, geb. DM 107,50; sfr. 106,50, geb. sfr. 110,10; $ 24,75, geb. $ 25,60; £8/17/-, geb. £9/3/-.

In der ersten Abhandlung des neuen Bandes behandelt *A. R. H. Cole* „Infrared Spectra of Natural Compounds". Wir finden hier eine recht ausführliche Beschreibung des Apparativen, und der Mikrochemiker wird sich besonders für das reflektierende Mikroskop des Autors interessieren, das noch mit 10-μg-Proben das Infrarotspektrum aufzunehmen gestattet. Wir finden hier auch eine umfangreiche Tabelle der charakteristischen Frequenzen und schließlich die Anwendung der Methodik auf das Gebiet der Steroide, Terpenoide und langkettigen Polyene. *O. Th. Schmidt* bringt dann die in der vorliegenden Schriftenreihe noch nicht behandelten „Gallotannine und Ellagengerbstoffe", über die er selbst viel gearbeitet hat. Im Anschluß an den 7. Band der Reihe faßt *Ch. Tamm* das viel bearbeitete Gebiet der „Glykosidischen Herzgifte" zusammen, worüber auch noch in tabellarischer Form ein geschlossener Überblick gegeben wird. Ein Klassiker des Gebietes der Tropolone, *Nozoe*, stellt in seinem wohlgeordneten Artikel die physikalischen und chemischen Eigenschaften dieser interessanten Verbindungen und ihre Biogenese heraus. Als „Der Anthranilsäure nahestehende Alkaloide" faßt *J. R. Price* im wesentlichen die 2- oder 4-Hydroxychinoline und -chinazoline auf, während die Strychnos-, Harmala-, Yohimbé- und andere Basen nicht berücksichtigt werden; hier hat Referent Bedenken dagegen, die Umwandlung des Evoxins in Evoxoidin, bei der das C-Skelett unverändert bleibt, als Pinakolinumlagerung zu betrachten. Wie im Band 10 behandelt auch im vorliegenden Bande *A. Chatterjee* (née *Mookerjee*), und zwar mit *S. C. Pakrashi* und *G. Werner*, die Rauwolfiabasen, ein Gebiet, das in letzter Zeit mit größter Intensität gefördert wurde. Den Band beschließen *W. Graßmann* und *E. Wünsch* mit der „Synthese von Polypeptiden", die ebenfalls in dieser Serie noch nicht behandelt wurde.

Drei von den sieben Artikeln haben europäische Autoren, nordamerikanische kommen diesmal nicht zu Worte. Die deutschsprachigen Artikel verwenden noch durchwegs die Bezeichnung „Oxy-" (statt „Hydroxy-") für den Substituenten OH.

Die außerordentliche Sorgfalt der Herstellung, die ausgezeichnete Ausstattung des Bandes, die umfassende Zitierung des meist sehr umfangreichen Schrifttums sind traditionelle Züge dieser Schriftenreihe, auf die wohl nicht wieder hingewiesen werden muß. Sie hat sich längst als unentbehrlich erwiesen, wenn jemand sich über die behandelten Gebiete verläßlich und vollständig informieren will. *F. Kuffner*-Wien

G. Gorbach: **Mikrochemisches Praktikum.** Bd. VII der Anleitungen für die chemische Laboratoriumspraxis. Herausgegeben von *H. Mayer-Kaupp.* Mit 72 Abb., VIII, 123 S. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag. 1956. Steif geh. DM 15,—.

Wie in der Einleitung des als Einführung in die mikrochemische Arbeitsweise bestimmten Buches betont wird, beschränkt sich der Verfasser auf die schon von *Emich* nach der Einwaage abgegrenzten Milligrammverfahren, die vor allem von Anlernkräften in Industrielaboratorien leicht und sicher auszuführen sind. Für diesen Einwaagebereich zwischen 1 und 200 mg mußte eine weitgehende Typisierung und Vereinfachung der Gefäße und Geräte erfolgen, um rasches und einfaches Arbeiten zu ermöglichen. So wird es verständlich, daß nach eingehender Beschreibung der vom Autor konstruierten Torsionswaage fast die Hälfte des Buches der Beschreibung mikrochemischer Geräte und deren Anwendung gewidmet ist. Diese Darstellung ist klar, leicht verständlich und mit guten Abbildungen versehen. Daran schließt sich eine Reihe meist schon durch Lehrbücher bekannt gewordener Methoden der qualitativen, präparativen und quantitativen Mikrochemie in Form von Übungsbeispielen, die Bestimmung physikalischer Konstanten und eine vom Verfasser ausgearbeitete Methode zur Anreicherung von Spurenelementen zum Zweck ihrer spektralanalytischen Bestimmung. Ein Literatur- und Sachverzeichnis erleichtert das Auffinden der gesuchten Stellen; Bestellnummern für die einzelnen Glas- und Metallgeräte ergänzen die Übersicht.

Das Buch enthält leider einige Mängel, die sich aber gegebenenfalls in einer Neuauflage leicht beheben lassen. So fehlt z. B. die Angabe der Dimensionen bei der Formel für die Ermittlung des Wasserwertes und die im Text erwähnte Tafel zu dessen Berechnung auf S. 102. Der Wassergehalt sollte nicht als „Feuchtigkeit" bezeichnet (S. 102) und die Formel zur Berechnung des spezifischen Gewichtes genau erklärt werden (S. 109). Die Bezeichnung von Natriumdiäthyldithiocarbamat als Diäthyldithizon ist fehlerhaft, auch eine Reihe von Hinweisen auf Seiten und Abbildungen (S. 6, 9, 20. 84). Auf S. 102 findet sich dreimal hintereinander eine fehlerhafte Rechtschreibung von Acetylen.

In seiner klaren und übersichtlichen Art wird dieses Praktikum sicherlich ein guter Behelf für alle Studierenden der Mikrochemie und für technische Assistenten sein und kann daher empfohlen werden. *H. Ballczo*-Wien

R. Herrmann: **Flammenphotometrie.** Mit 90 Textabb., VIII, 327 S. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag. 1956. Ganzl. DM 39,60.

Was dem Praktiker an dieser seit dem Standardwerk von *Lundegårdh* ersten deutschen Monographie über die Flammenspektroskopie auffällt, ist das besondere Fingerspitzengefühl, mit dem die Erkennung von Fehlerquellen behandelt wird, über die Mindergeübte und auch Erfahrene sehr oft hinwegsehen. Ebenso wohltuend empfindet der Praktiker — und für diesen ist das Buch vor allem geschrieben —, daß der theoretische Abschnitt neben den Grundbegriffen insbesondere auf jene Probleme beschränkt ist, die sich im Lauf der praktischen Arbeit ergeben. Diese theoretischen Abhandlungen sind in gut verständlicher Form auch dem Nichtphysiker zugänglich. Für den Analytiker wertvoll ist die Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile flammenphotometrischer und chemischer Methoden einerseits, der flammenphotometrischen und sonstigen spektrochemischen Verfahren andrerseits.

Die Wahl der jeweils passenden analytischen Methode wird damit erleichtert. Der Nachteil, daß sich verschiedene Elemente gegenseitig beeinflussen, ist allerdings nicht eine Eigenheit spektroskopischer Methoden allein. Auch sollte der Vorteil der Dokumentationsmöglichkeit durch photographische Platte oder Schreiber nicht unerwähnt bleiben.

In übersichtlicher und einprägsamer Form werden Meßmethoden und Apparate behandelt, wobei dem Arbeiten mit komprimierten Gasen besonderes Augenmerk geschenkt wird. Sehr dankbar dürfte der Analytiker auch für die eingehende Beschreibung der Zerstäuber sein, wie er auch in den Kapiteln über Optik und Elektronik wohl alles zur Beurteilung und Auswahl eines Gerätes Erforderliche finden wird. Von den käuflichen Apparaten sind nur einige, für ihre Art typische angeführt, doch vermissen wir im Hinblick auf deren immer mehr steigenden Einsatz die Anführung einiger selbstregistrierender Geräte. Auch die spektrographischen Methoden sind nicht vergessen. Und wenn die Geräte mit photographischer Registrierung heute gegenüber den direkt anzeigenden zurücktreten, so ist doch durch hinreichende Literaturhinweise für die Auffindung der nötigen Angaben gesorgt. Eine sinnstörende Ausdrucksweise über die Verwendung der Seideltransformation wäre bei einer Neuauflage zu berichtigen. Ein anderes Anliegen wäre die Wiedergabe der sehr instruktiven Spektren auf S. 271 bis 274 nicht im Positiv, sondern so, wie sie auf den fertigen Photoplatten erscheinen. Dadurch kämen nicht nur die Linien, sondern auch der Untergrund und damit die wirklichen Intensitätsverhältnisse besser zum Ausdruck.

Einen besonders breiten Raum nimmt das Kapitel „Ausführung der Analysen" ein. Hier wird in wirklich ausführlicher Art von der Einrichtung des Arbeitsraumes, der Erstellung einer Arbeitsvorschrift, verschiedenen Meßmethoden bis zur Fehlererkennung und -vermeidung alles gebracht, was nicht nur den mit der Flamme arbeitenden, sondern den Spektroskopiker im allgemeinen interessiert. Schon allein dieser Angaben wegen sollte das Buch bei keinem Spektroskopiker fehlen.

Die Anwendungen der Flammenspektroskopie sind auf 13 verschiedene Sparten ausgedehnt, besondere Berücksichtigung finden unter anderem Medizin, Landwirtschaft, Treibstoff- und Öluntersuchungen. Zugunsten eines tragbaren Umfanges vermißt man zwar ausführliche Arbeitsvorschriften, aber ein ausgezeichnetes und recht umfangreiches Literaturverzeichnis (über 600 Zitate) wird in den meisten Fällen ein Wegweiser zur Lösung eines Problems sein. Dafür sind ausführliche Probenahmevorschriften gegeben und auf besonders heimtückische Fehlerquellen wird vorsorglich hingewiesen. Ebenso ausführlich ist in verschiedenen Fällen die Vorbereitung der Substanz bis zur fertigen Lösung beschrieben.

Besonders wertvoll ist die Tabelle der gegenseitigen Beeinflussungen, die für 15 Elemente die Art der Störung, die Störelemente und die zugehörige Literatur angibt. Eine weitere Bereicherung erfährt das Buch durch verschiedene Angaben über die Analysenlinien und -banden, von denen die wichtigsten — geordnet nach dem periodischen System — ausführlicher besprochen werden. Eine weitere Tabelle gibt die günstigsten Wellenlängen und die untere Nachweisgrenze in mg/l für 22 Elemente an; in einer eigenen Übersicht sind die unteren Grenzkonzentrationen 15 seltener Erden zusammengestellt.

Ein Gesamtverzeichnis von Flammenlinien und -banden, alphabetisch nach dem Symbol der 61 verzeichneten Elemente, anderseits auch nach Wellenlängen geordnet, findet sich am Ende des Buches. Insgesamt sind

492 Linien und Banden im Bereich von 2000 bis 10000 Å tabelliert. Hier möchte Rezensent anregen, zu den jeweiligen Linien noch eine relative Intensitätsskala anzugeben, wie dies etwa in den M. I. T. Tables von *Harrison* der Fall ist.

Die eigentliche Mikrochemie wird durch einen Mikrozerstäuber und durch ein eigenes, allerdings etwas kurzes Kapitel bedacht. Auch hier ist mit einigen Literaturhinweisen der Weg zur Lösung von Problemen angedeutet. Eine ausführliche Beschreibung von Mikro- und Ultramikroverfahren kann wohl im Rahmen *dieses* Buches keinen Platz finden, aber den Fragen der Anreicherung und der Abtrennung von Ballaststoffen bei der Spurenanalyse sollte ein etwas breiterer Raum in den Literaturhinweisen geschenkt werden, da wohl gerade in der Kombination naßchemischer Anreicherung und physikalischer Nachweismethode die Zukunft der Beherrschung kleinster Quantitäten liegt.

Das Buch ist drucktechnisch sehr gut ausgestattet; verschiedene Druckfehler, insbesondere die verkehrte und verdrehte Abb. 2 auf S. 21 sowie die Verwechslung von Ca und K in der Zahlentabelle auf S. 199, werden sich bei einer Neuauflage leicht vermeiden lassen. Dem Leser hilft nicht nur ein guter Index, sich rasch zurechtzufinden, es wurde außerdem sorgfältig darauf geachtet, die einzelnen Erläuterungen mit Seiten- und Kapitelhinweisen zu versehen, so daß mit deren Hilfe direkte Querverbindungen durch das ganze Buch geschaffen sind, die die Verfolgung eines Gedankens ohne zeitraubendes und ermüdendes Suchen flüssig gestalten. Alles in allem ist es ein vorzügliches Werk, und da sich heute wohl die meisten Analytiker spektroskopischer Methoden bedienen müssen, ist eine solche Monographie besonders zu begrüßen.

H. Svejda-Wien

W. Klemm: **Anorganische Chemie.** Neunte Auflage. Mit 18 Abb. 184 S. 20 S. Gesamtverz. der Sammlung Göschen. (Sammlung Göschen Band 37.) Berlin: W. de Gruyter & Co. 1956. DM 2,40.

Der Verfasser hat in diesem Buch die anorganische Chemie in jener Form behandelt, in der sie als einführende Vorlesung für Naturwissenschaftler an den Hochschulen gehalten wird. Die vorliegende 9. Auflage zeigt, daß das Bemühen des Autors von seiner Leserschaft mit Dank aufgenommen wurde, die den klaren Stil und die eindeutige Formulierung zu schätzen weiß. Der notwendige Einbau von physikalischen und physiko-chemischen Untersuchungen und Überlegungen ist didaktisch gut gelungen und zeigt richtig die Stellung der anorganischen Chemie zu den Grenzwissenschaften. Mit Freude stellt man fest, daß sich keine sinnstörenden Druckfehler eingeschlichen haben und daß neueste Erkenntnisse mit verarbeitet wurden.

A. Brukl-Wien

Lipp, W.: **Histochemische Methoden.** Eine Sammlung. Lieferung IX—XI. Je 24 S. München: R. Oldenbourg. 1956. Pro Lief. DM 6.—.

In der IX. Lieferung wird eine umfassende Darstellung der Feulgenreaktion, der ältesten und bewährtesten histochemischen Methode für den spezifischen Nachweis von Desoxyribonukleinsäure, gegeben. Die Beschreibung der

Technik, die Hinweise auf die Lokalisation, Spezifität und quantitative Auswertung müssen als vorbildlich bezeichnet werden.

Die X. und XI. Lieferung enthält neben den Angaben für die Herstellung von Ribonuklease, Pankreas-Desoxyribonuklease und Thymus-Desoxyribonuklease auch die Beschreibung der histochemischen Methodik zum Nachweis von Cystein, Cystin und von Sulfhydrylgruppen.

Von Wichtigkeit ist oft die Entfernung der Nukleinsäuren aus dem histologischen Schnitt. Die hiefür ausgearbeiteten fermentativen und nichtenzymatischen Extraktionsverfahren werden angeführt, und es sei besonders vermerkt, daß der Autor nicht versäumt hat, die erheblichen Nachteile der nicht-enzymatischen Extraktion aufzuzeigen.

Überblickt man die bisher erschienenen Lieferungen, so muß gesagt werden, daß die Form der Erscheinung in Blättern sich voll und ganz bewährt hat und es der Autor vorzüglich versteht, die einzelnen Verfahren und Techniken exakt wiederzugeben, wobei stets auch die neueste Literatur verarbeitet wird. Vom mikrochemischen Standpunkt aus bliebe noch zu wünschen, daß in den folgenden Lieferungen mehr als bisher die quantitativen histochemischen Methoden, wie sie insbesondere von *Linderstrøm-Lang* und *Holter* entwickelt wurden, Berücksichtigung finden mögen.

W. Stöckl-Wien

Sehr geehrter Herr Lange!

Wir kennen zwar Ihre Abneigung gegen wortreiche Adressen anläßlich persönlicher Festtage, wollen es uns aber doch nicht versagen, Ihnen zu Ihrem 70. Geburtstag am 26. April d. J. in corpore unsere herzlichsten Glückwünsche zu entbieten.

Was Sie seit 20 Jahren im Interesse unserer Zeitschrift und damit für die Belange der mikrochemischen Wissenschaft geleistet haben, geht weit über den üblichen Rahmen verlegerischer Verdienste hinaus. Neben viel nderem ist da vor allem auf die Tatsache hinzuweisen, daß es der tatkräftigen Initiative Ihres Hauses zu danken ist, daß unser Archiv nach der totalen Vernichtung des Jahres 1945 nicht nur neu erstand und seine führende Stellung in kurzer Zeit wieder errang, sondern darüber hinaus eine stetig steigende Entwicklung nimmt. Ihr stets verständnisvolles Interesse und Ihre immer wieder bekundete Bereitwilligkeit zur Förderung der wissenschaftlichen Literatur haben Ihr Unternehmen, den Springer-Verlag Wien, zu dem bedeutendsten seiner Art in Österreich gemacht, seinen Publikationen zur Anerkennung in der ganzen wissenschaftlichen Welt verholfen und Sie persönlich mit vielen Ihrer Mitarbeiter in Freundschaft fest verbunden.

So dürfen Sie uns also wohl gestatten, unseren Dank auch einmal öffentlich auszusprechen und zu versichern, daß wir uns mit Ihnen verbunden fühlen in dem Wunsch: ad multos annos!

Die Herausgeber von

„MIKROCHIMICA ACTA“

Abkürzungen	Abbreviations	Abréviations
Acta Chem. Scand.	Acta Chemica Scandinavica
Amer. J. Physiol.	American Journal of Physiology
Analyst	The Analyst
Analyt. Chemistry	Analytical Chemistry
Analyt. Chim. Acta	Analytica Chimica Acta
Angew. Chem.	Angewandte Chemie (bis 1932 Zeitschrift für angewandte Chemie)
Ann. Chem.	Liebigs Annalen der Chemie
Ann. chim.	Annales de chimie
Ann. Physik	Annalen der Physik
Ann. physique	Annales de physique
Arch. Biochemistry	Archives of Biochemistry
Arch. Pharmaz.	Archiv der Pharmazie und Berichte der deutschen pharmazeutischen Gesellschaft
Arch. sci. phys. nat.	Archives des sciences physiques et naturelles
Ark. Kemi (Mineral. Geol.)	Arkiv för Kemi (Mineralogi och Geologi)
Atti accad. Lincei (Rend.)	Atti della accademia nazionale dei Lincei (Rendiconti)
Ber. dtsch. chem. Ges.	Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (bis 1944)
Biochemic. J.	Biochemical Journal
Biochem. Z.	Biochemische Zeitschrift
Biochim. Biophys. Acta	Biochimica et Biophysica Acta
Bull. soc. chim. Belgique	Bulletin de la société chimique de Belgique
Bull. soc. chim. biol.	Bulletin de la société de chimie biologique
Bull. soc. chim. France	Bulletin de la société chimique de France
Canad. J. Chem.	Canadian Journal of Chemistry
Chem. Abstr.	Chemical Abstracts
Chem. and Ind.	Chemistry and Industry
Chem. Ber.	Chemische Berichte
Chem. Eng. News	Chemical and Engineering News
Chemie	Die Chemie (1942—1945)
Chem. Fabrik	Die chemische Fabrik (bis 1941)
Chem. Industrie	Die chemische Industrie
Chem. Ing. Techn.	Chemie-Ingenieur-Technik
Chem. Weekbl.	Chemisch Weekblad
Chem. Zbl.	Chemisches Zentralblatt
Chem.-Ztg.	Chemiker-Zeitung
C. r. acad. sci., Paris	Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'académie des sciences, Paris
Exper.	Experientia
Gazz. chim. ital.	Gazzetta chimica italiana
Helv. Chim. Acta	Helvetica Chimica Acta
Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed.	Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition (bis 1947)
J. Amer. Chem. Soc.	Journal of the American Chemical Society
J. Biol. Chem.	Journal of Biological Chemistry
J. Chem. Education	Journal of Chemical Education
J. Chem. Physics	Journal of Chemical Physics
J. Chem. Soc. London	Journal of the Chemical Society London
J. Chem. Soc. Japan	Journal of the Chemical Society of Japan
J. Gen. Chem. USSR	Journal of General Chemistry USSR
J. Org. Chem.	Journal of Organic Chemistry

J. Physic. Chem.	Journal of Physical Chemistry
J. Physic. Coll. Chem.	Journal of Physical and Colloid Chemistry
J. Physiol.	Journal of Physiology
J. Polymer Sci.	Journal of Polymer Science
J. prakt. Chem.	Journal für praktische Chemie (bis 1943)
J. Soc. Chem. Ind.	Journal of the Society of Chemical Industry
Klin. Wschr.	Klinische Wochenschrift
Kolloid-Beih.	Kolloid-Beihefte
Kolloid-Z.	Kolloid-Zeitschrift
Mikrochem.	Mikrochemie vereinigt mit Mikrochimica Acta (bis 1953)
Mikrochim. Acta [Wien]	Mikrochimica Acta
Mh. Chem.	Monatshefte für Chemie
Nature	Nature (London)
Naturwiss.	Die Naturwissenschaften
Österr. Chem.-Ztg.	Österreichische Chemiker-Zeitung
Physik. Z.	Physikalische Zeitschrift
Proc. Roy. Soc. London	Proceedings of the Royal Society of London
Rec. trav. chim. Pays-Bas	Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas
Science	Science
Svensk Kem. Tidskr.	Svensk Kemisk Tidskrift
Trans. Faraday Soc.	Transactions of the Faraday Society
Z. analyt. Chem.	Zeitschrift für analytische Chemie
Z. anorg. Chem.	Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie
Z. Elektrochem.	Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie
Z. Naturforsch.	Zeitschrift für Naturforschung
Z. Kristallogr.	Zeitschrift für Kristallographie, Kristallgeometrie, Kristallphysik, Kristallchemie
Z. Physik	Zeitschrift für Physik
Z. physik. Chem.	Zeitschrift für physikalische Chemie
Z. physiol. Chem.	Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie

Die Autoren werden dringend gebeten, bei allen Literaturzitaten anzugeben:

1. Titel der Zeitschrift in obenstehender Abkürzung,
2. Eventuelle Serienzahl in eckiger Klammer,
3. Bandzahl unterstrichen,
4. Seitenzahl,
5. Jahreszahl in runder Klammer.

The authors are urged to cite all the references as follows:

1. Abbreviated title of the periodical according to the above list,
2. eventual number of series, enclosed in crotchets (square brackets),
3. number of volume, underlined,
4. page-number,
5. year, enclosed in parentheses (round brackets).

Les auteurs sont instamment priés d'indiquer leurs sources comme suit:

1. titre abrégé du périodique selon liste ci-dessus,
2. numéro éventuel de la série, entre crochets,
3. numéro du volume, souligné,
4. page,
5. année, entre parenthèses ordinaires.

Herausgeber, Eigentümer und Verleger: Springer-Verlag in Wien, I., Mölkerbastei 5. — Für den Inhalt verantwortlich: Prof. Dr. *Michael Karl Zacherl*, Wien, XIX., Chimanistraße 21
Druck: Manzsche Buchdruckerei, Wien, IX., Lustkandlgasse 52

Aus dem II. Chemischen Institut der Universität Wien

Über scheinbare Anomalien bei der Bestimmung des aktiven Wasserstoffs von Chinolacetaten*

Über die Einwirkung metallorganischer Verbindungen auf Chinole. IX[1]

(Beitrag zum Reaktionsmechanismus)

Von

G. Kainz, O. Polansky, E. Schinzel und **F. Wessely**

Mit 2 Abbildungen

(Eingelangt am 5. Oktober 1956)

F. Wessely und Mitarbeiter[2–6] haben in den vorangegangenen Arbeiten dieser Reihe die Reaktion verschiedener Chinolacetate** mit einigen metallorganischen Verbindungen*** untersucht und dabei zwei Reaktionstypen festgestellt. Die in den zitierten Arbeiten[2–6] *auf Grund der isolierten Zwischen- und Endprodukte aufgestellten Reaktionsmechanismen* ließen für die einzelnen Chinolacetate — sofern deren Reaktion nach dem angegebenen Mechanismus quantitativ abläuft — auch bei der Zerewitinoffbestimmung eine bestimmte Menge Reagensverbrauch sowie eine bestimmte Menge akt. H erwarten. Diese Voraussagen sind um so interessanter, als sie nicht immer mit den in Hinblick auf die Konstitutionsformel zu erwartenden Resultaten bei der Zerewitinoffbestimmung im Einklang stehen, weshalb wir sie durch quantitative Versuche zu beweisen suchten.

Zur Durchführung dieser Versuche schien besonders die Apparatur von *A. Soltys*[7] geeignet, mit der man sowohl das vom aciden H ent-

* Herrn Univ.-Prof. Dr. *H. Lieb* zum 70. Geburtstag gewidmet.

** 2-Methyl-o-chinol-acetat[2,6], 2-Phenyl-o-chinol-acetat[2], 2,4,6-Tri-methyl-o-chinol-acetat[2,5,6], 4-Methyl-p-chinol-acetat[2,4,6], 4-Phenyl-p-chinol-acetat[2,4], 2,4,6-Tri-methyl-p-chinol-acetat[2,5] und 4-Methyl-o-chinon-di-acetat[3].

*** CH_3MgJ, CH_3MgBr, CH_3Li, C_2H_5MgBr, $i\text{-}C_4H_9MgBr$, C_6H_5MgBr, C_6H_5Li. In der Folge kürzen wir metallorganische Verbindungen mit RZ ab, wobei R = Alkyl- oder Arylgruppe und Z = MgX bzw. Li bedeuten.

wickelte RH ($\equiv E^*$) als auch den Verbrauch an gebundenem Reagens ($\equiv V^*$) bestimmen kann. Um gleichzeitig auch ein Bild vom Verhalten verschiedener metallorganischer Verbindungen zu bekommen, wurden außer dem bei Zerewitinoffbestimmungen üblichen CH_3MgJ bzw. CH_3MgBr[8] auch C_2H_5MgJ und C_2H_5MgBr sowie CH_3Li und $LiAlH_4$** herangezogen.

Es gelang ohne besondere Schwierigkeit, die genannten metallorganischen Verbindungen direkt in dem hierfür gebräuchlichen Di-iso-amyl-äther herzustellen. Für $LiAlH_4$ besitzt jedoch Di-iso-amyl-äther ein zu geringes Lösungsvermögen. Von den sonst in Frage kommenden Lösungsmitteln, wie Di-n-butyl-äther[9], Di-n-propyl-äther[10], N-Äthyl-morpholin[9], sowie Tetrahydrofuran und anderen niedrig siedenden Äthern haben wir Tetrahydrofuran gewählt, das bisher für quantitative Bestimmungen noch nicht erprobt worden war. Dessen Verwendung in der Soltysapparatur, die nur für Reagenslösungen mit geringem Dampfdruck konstruiert ist, verursachte zwar anfangs — zufolge des merklichen Dampfdruckes — einen Leerwert von 1,2 ml. Seine Kompensation wäre sicherlich mittels eines Pettersonkompensators[11] möglich gewesen, doch hätte dies der Einfachheit der Soltysapparatur Abbruch getan. Wir konnten nun diesen Leerwert ohne wesentliche apparative Änderungen dadurch ausschalten, daß wir den Stickstoff, der zum Spülen der Apparatur diente, mit Lösungsmitteldampf sättigten.

2-Methyl-o-chinol-acetat und Eisessig

Das zuerst untersuchte *2-Methyl-o-chinol-acetat (I)* ließ auf Grund der Konstitutionsformel keinen aktiven Wasserstoff ($E = 0$), jedoch einen Verbrauch von 3 Mol Reagens ($V = 3$), und zwar 1 Mol für die Keto- und 2 Mol für die Estergruppe erwarten. Hingegen war auf Grund des von *F. Wessely* und Mitarbeitern[2,4,6] aufgestellten Reaktionsschemas mit 1 akt. H ($E = 1$), sowie mit dem Verbrauch von zusätzlich 2, unter gewissen Umständen sogar 3 Molen Reagens ($V = 2$ *bzw.* 3) zu rechnen. Dies geht aus dem angeführten Schema 1 hervor.

Zunächst findet *1,4-Addition* von 1 Mol RZ (1. Mol) an das konjugierte System von I statt. Die Bevorzugung der Carbonylgruppe des Ringes gegenüber der Estergruppierung erklärt sich nach *C. E. Entemann* jr. und *J. R. Johnson*[12] damit, daß Ketogruppen mit RZ rascher reagieren als Estergruppen. II spaltet Z-Acetat (IV) ab, wobei sich ein Zwischenprodukt III bildet, das in prototropem Gleichgewicht mit dem Phenol VIII steht. Diese beiden Verbindungen müssen mit überschüssigem RZ unter Bildung der Verbindung IX und Entwicklung von 1 RH weiterreagieren.

Das abgespaltene Z-Acetat (IV) bildet unter Addition eines weiteren Moles RZ (2. Mol) das Ketalsalz V. Es schien möglich, daß V unter Um-

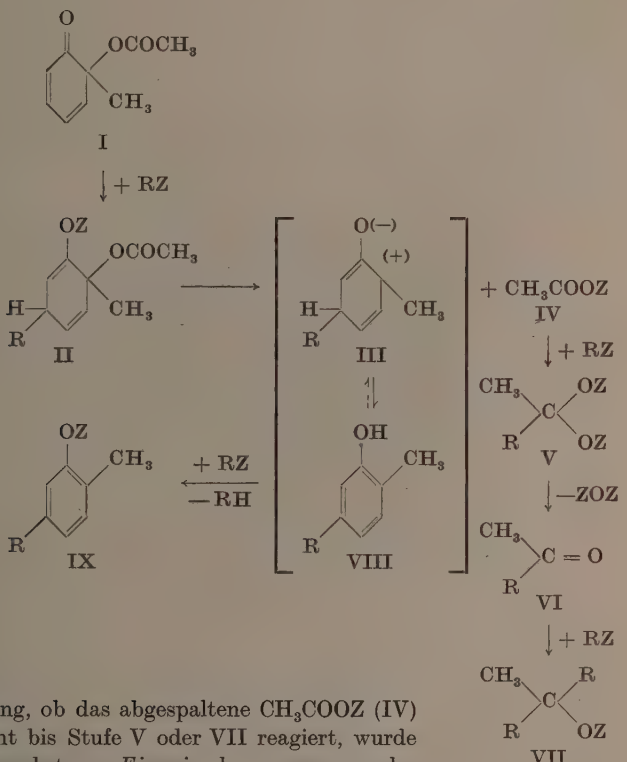
---

* In der Folge geben wir E und V ohne weitere Benennung in Molen je Mol Substanz an.

** Die Reaktionsweise von $LiAlH_4$ ist derjenigen von metallorganischen Verbindungen analog, wobei $R = H^-$ bzw. $Z = -AlH_x$ ($x = 0, 1, 2, 3$) zu setzen ist.

ständen, die noch zu prüfen waren, ZOZ abspalten könnte. Das dabei entstehende Keton VI würde dann ein weiteres Mol (3. Mol) unter Bildung des Carbinolsalzes VII addieren.

Schema 1:



Zur Klärung, ob das abgespaltene CH_3COOZ (IV) im Experiment bis Stufe V oder VII reagiert, wurde als Vergleichssubstanz *Eisessig* herangezogen, der nach Umsatz mit einem Mol RZ (unter Freisetzung von RH) ebenfalls CH_3COOZ ergibt.

Wir fanden, daß die *Reaktion des Eisessigs bei 100° in Anisol* als Lösungsmittel bis V, in *Pyridin* aber zum Teil bis VII geht*. Aus diesem Grunde haben wir zur Erzielung klarer Verhältnisse sämtliche Reaktionen in Anisol durchgeführt; alle weiteren Angaben beziehen sich auf dieses Lösungsmittel.

Interessant ist auch die Beobachtung, daß die Carbonylgruppe der Essigsäure bei 20° nicht mit RZ reagiert. Somit sind alle bei 20° ge-

* Dies könnte durch die größere Dielektrizitätskonstante des Pyridins (12,4) gegenüber Anisol (4,35) zu erklären sein[13].

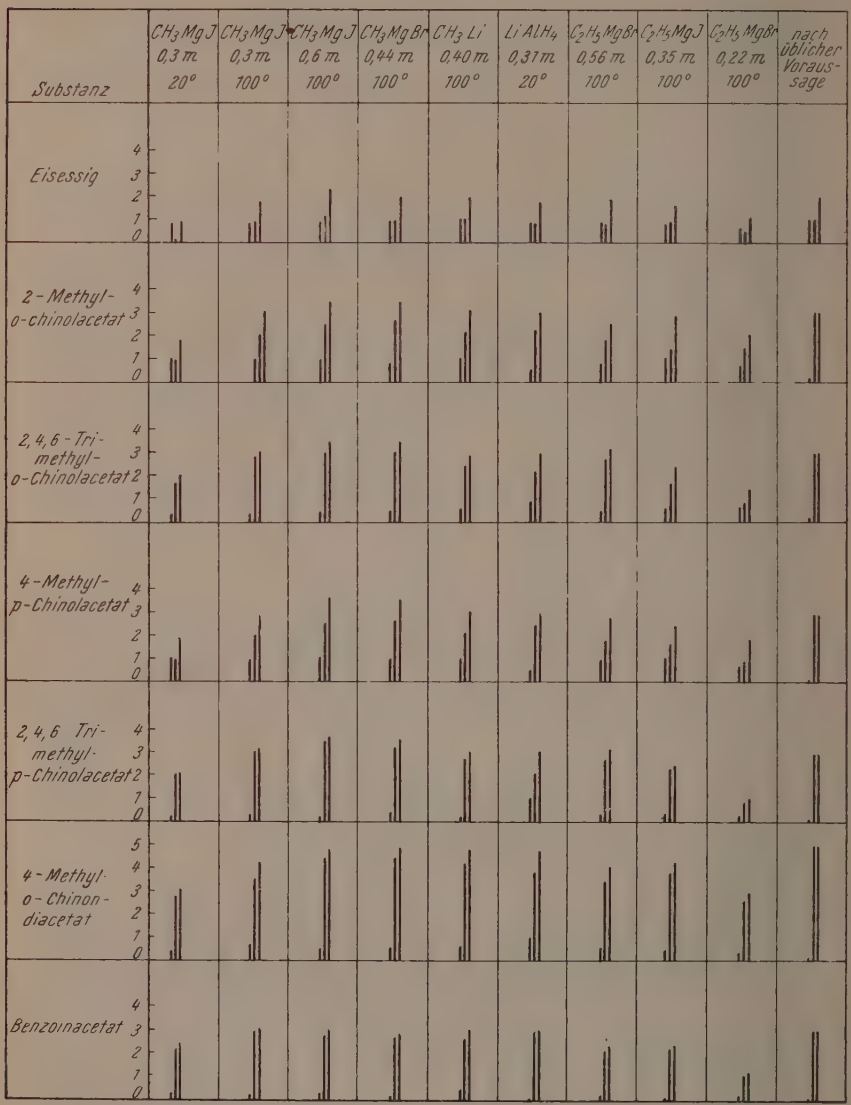


Abb. 1. Experimentell gefundene Werte RH (= *E*) bzw. RZ (= *V*), ausgedrückt in Molen je Mol Substanz. In den einzelnen Rubriken bedeutet die erste Angabe *E*, die zweite *V* und die dritte (*E* + *V*)

fundenen Ergebnisse ohne Beteiligung des abgespaltenen CH_3COOZ zu verstehen, da dieses erst bei 100° mit RZ in Reaktion tritt.

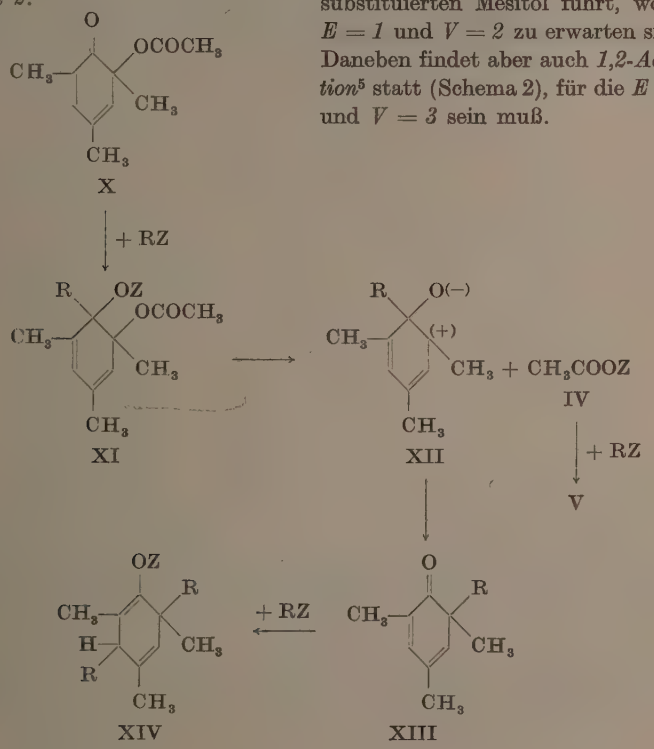
Tatsächlich haben wir bei 20° mit 2-Methyl-o-chinol-acetat (vgl. Abb. 1) $E = 1$ und $V = 1$ gefunden, während bei 100° (infolge Weiterreaktion des CH_3COOZ) $E = 1$ und $V = 2$ nachgewiesen wurden. Dies steht in Übereinstimmung mit dem angenommenen Reaktionsverlauf.

Die Werte für akt. H (E) sind sicher infolge einer in geringem Maße nebenher laufenden *Reduktion* etwas nach oben verfälscht, da bei präparativen Arbeiten mit ähnlichen Reagenzien sehr kleine Mengen von Reduktionsprodukten (Phenole, die den angewendeten Chinolacetaten entsprechen) gefunden wurden. Über den Reduktionsmechanismus können wir vorläufig noch keine Angaben machen.

2,4,6-Tri-methyl-o-chinol-acetat

Bei dieser Verbindung (X) haben *F. Wessely* und Mitarbeiter die bei o-Chinolacetaten übliche *1,4-Addition*[2] festgestellt, die analog dem Schema 1 abläuft und zu einem substituierten Mesitol führt, wobei $E = 1$ und $V = 2$ zu erwarten sind. Daneben findet aber auch *1,2-Addition*[5] statt (Schema 2), für die $E = 0$ und $V = 3$ sein muß.

Schema 2:



X addiert zunächst RZ (1. Mol) in 1,2-Stellung unter Bildung von XI, das CH_3COOZ abspaltet, das wie im Schema 1 weiterreagiert (2. Mol RZ). Das verbleibende Zwischenprodukt XII stabilisiert sich durch Umlagerung zum Keton XIII, das seinerseits ein weiteres Mol RZ (3. Mol) aufnimmt und das Enolat XIV bildet.

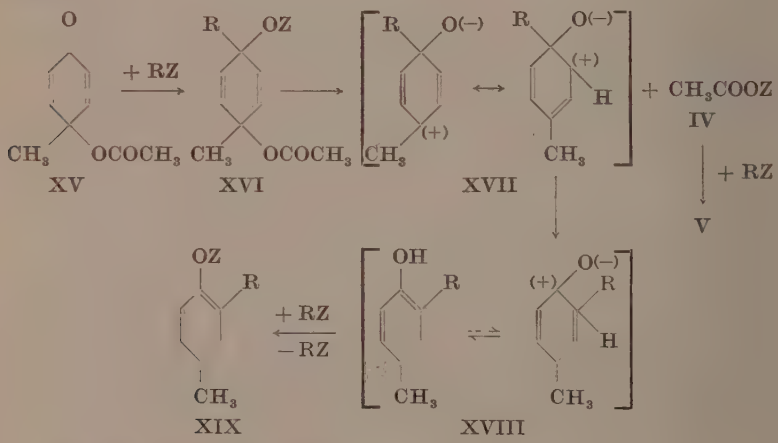
Da die 1.4- und die 1,2-Addition parallel verlaufende Vorgänge sind, war bei der quantitativen Bestimmung von vornherein nur zu erwarten, daß die Summe $E + V = 3$ betragen, E hingegen zwischen *0* und *1* variieren würde. Diese Voraussage wurde durch die Versuche bestätigt (vgl. Abb. 1).

Bei Verwendung von $LiAlH_4$ stabilisiert sich XII, da R = H ist, sofort unter Entwicklung von 1 RH zu Mesitol, so daß in diesem Falle sowohl bei 1,2-Addition (Schema 1) als auch bei 1,4-Addition (Schema 2) $E = 1$ und $V = 2$ resultieren. Auch diese Voraussage konnte experimentell bestätigt werden (vgl. Abb. 1).

4-Methyl-p-chinol-acetat

Bei 4-Methyl-p-chinol-acetat (XV) wird RZ (1. Mol) in *1,2-Addition* an die Ketogruppe des Ringes gebunden (vgl. Schema 3)[2,4,6]:

Schema 3:



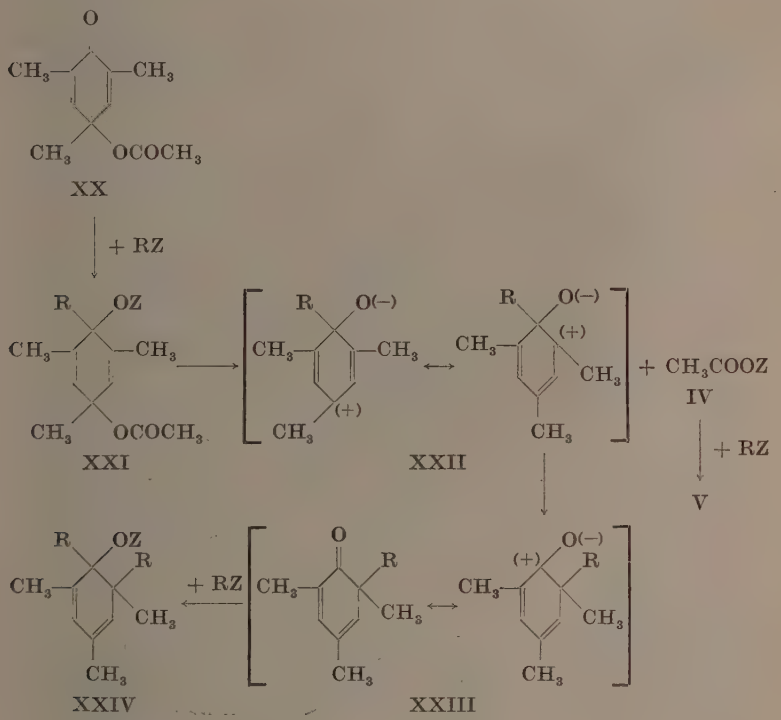
Die dabei entstehende Verbindung XVI spaltet CH_3COOZ ab, das mit RZ (2. Mol) wie oben weiterreagiert. Das aus XVI entstandene Zwischenprodukt XVII stabilisiert sich durch Umlagerung und Aromatisierung zu XVIII unter Freisetzung von 1 Mol RH, wobei das Phenolat XIX entsteht.

Demnach waren zu erwarten $E = 1$ und $V = 2$, was auch experimentell bestätigt werden konnte, während auf Grund der *Konstitutionsformel* mit $E = 0$ und $V = 3$ zu rechnen war.

2,4,6-Tri-methyl-p-chinol-acetat

Diese Verbindung (XX) reagiert analog wie 4-Methyl-p-chinol-acetat (XV), allerdings erfolgt die Stabilisierung der Zwischenprodukte auf einem anderen Wege als dort (vgl. Schema 4)[2,5]:

Schema 4:



Zunächst erfolgt 1,2-Addition (1. Mol RZ) zu Verbindung XXI, die CH_3COOZ (IV) abspaltet, das ein 2. Mol RZ verbraucht. Das bei der Acetatabspaltung zurückbleibende Zwischenprodukt XXII lagert sich zu XXIII um, das dem bei der Reaktion des 4-Methyl-p-chinol-acetats auftretenden Zwischenprodukt XVIII analog gebaut ist. Da jedoch die beiden o-Stellungen in XXIII — zum Unterschied von XVIII — durch Methylgruppen blockiert sind, besitzt XXIII keinen aciden H. Als Keton addiert es ein weiteres Mol RZ.

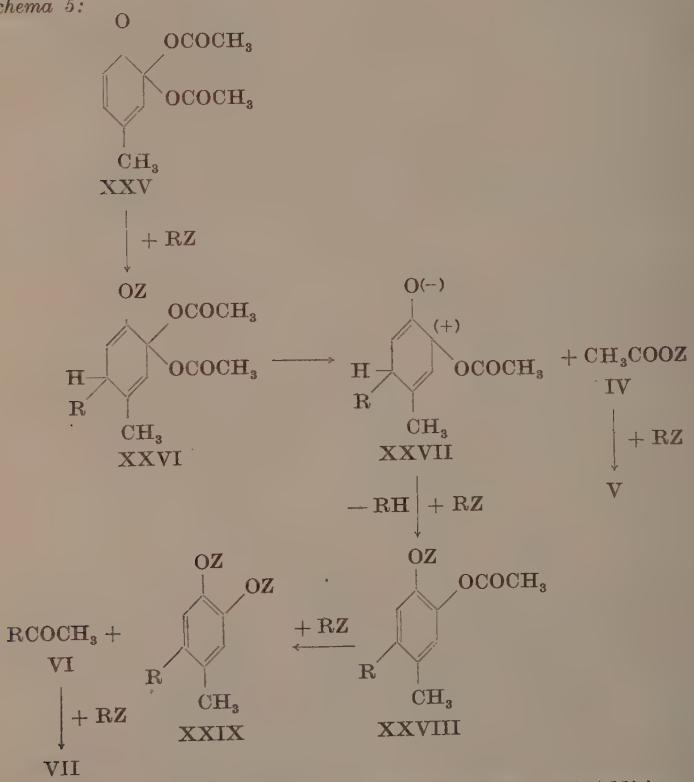
Als Endresultat scheinen demnach $E = 0$ und $V = 3$ auf. Nach der Konstitutionsformel waren zwar ebenfalls $E = 0$ und $V = 3$ zu erwarten, jedoch auf Grund ganz anderer Reaktionsschritte mit nur zufällig gleichem Endresultat.

Bei Verwendung von $LiAlH_4$ hingegen bedingt die Tatsache, daß R = H ist, einen aciden H bei XXII, so daß das 3. Mol RZ unter RH-Entwicklung verbraucht wird, also insgesamt $E = 1$ und $V = 2$ resultieren. Dieser durch das Experiment bestätigte Befund wäre ebenfalls nach herkömmlicher Betrachtungsweise nicht vorauszusagen gewesen.

4-Methyl-o-chinon-di-acetat

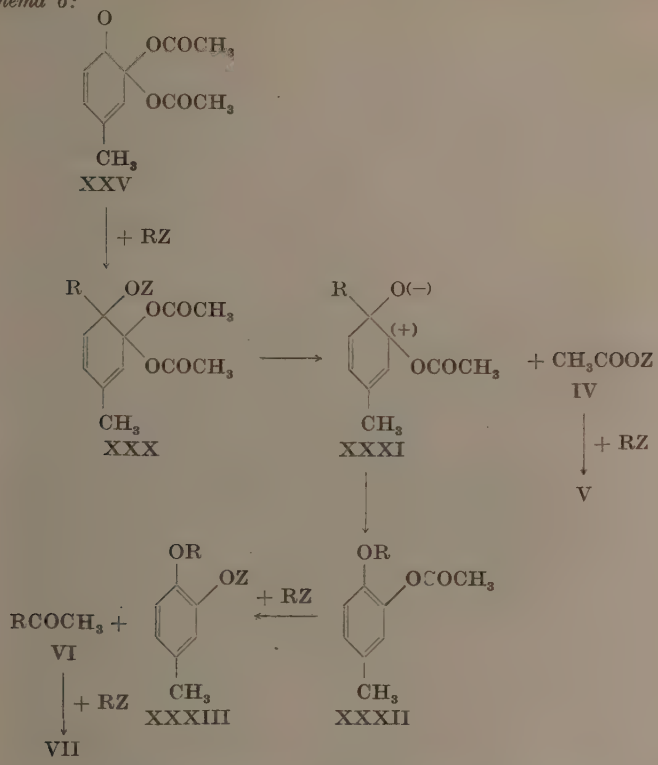
Auf Grund der präparativ isolierten Endprodukte[3] waren bei 4-Methyl-o-chinon-di-acetat (XXV) *zwei Reaktionswege* zu erwarten, die im Schema 5 und 6 wiedergegeben sind.

Schema 5:



Schema 5 ist gekennzeichnet durch primäre *1,4-Addition*, wobei Verbindung XXVI entsteht, die CH_3COOZ abspaltet, während die 2. Acetoxygruppe durch metallorganisches Reagens eine Acylspaltung erleidet. Daraus resultieren im Gesamten $E = 1$ und $V = 4$.

Schema 6:



Der zweite Reaktionsmechanismus (Schema 6) nimmt seinen Ausgang von einer *1,2-Addition* und läßt $E = 0$ und $V = 4$ erwarten.

Im Experiment wurden tatsächlich $V = 4$ und $E = 0{,}4$ *bis* $0{,}5$ (aus 1,4-Addition, Schema 5) gefunden. Dies beweist, daß beide Reaktionsfolgen parallel verlaufen.

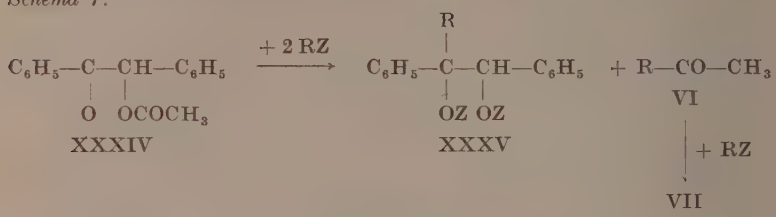
Da bei Verwendung von $LiAlH_4$ anstatt R ein H in das Molekül eintritt, besitzt XXXI einen aciden H, wodurch zusätzlich zu den 4 Molen gebundenem RZ noch 1 Mol RH in Freiheit gesetzt wird. Bei $LiAlH_4$ sind dadurch für *beide* Reaktionsschemata $E = 1$ und $V = 4$ vorauszusagen, was ebenfalls experimentell bestätigt werden konnte.

Benzoinacetat

Wir haben auch diese Verbindung in die quantitative Untersuchung einbezogen, da sie seinerzeit als Modellsubstanz für das Studium der Acetatabspaltung gedient hatte.

Benzoinacetat (XXXIV) reagiert nach zwei verschiedenen Reaktionsfolgen, je nachdem, ob RZ im Überschuß oder in äquimolaren Mengen zugesetzt wird[6]. Schema 7 gibt den Reaktionsmechanismus mit *überschüssigem RZ* wieder, auf den allein wir uns beziehen, weil auch bei der Zerewitinoffbestimmung mit überschüssigem RZ gearbeitet wird. Wie aus Schema 7 folgt, muß $E = 0$ und $V = 3$ erwartet werden. Bei den quantitativen Messungen wurde dies auch tatsächlich gefunden.

Schema 7:



Ergebnisse

Wie diese Versuche zeigen, treffen die nach der Konstitutionsformel zu erwartenden Resultate bei der Zerewitinoffbestimmung von Chinolacetaten nicht immer experimentell zu. Die gemessenen RH- und RZ-Mengen (E bzw. V) finden in den von *F. Wessely* und Mitarbeitern aufgestellten Reaktionsschematas ihre Erklärung. *Bruchteile eines Moles RH bzw. RZ* folgen zwanglos aus der Konkurrenz zweier Reaktionsabläufe, die sich bezüglich E oder V unterscheiden. Weiters zeigt diese Arbeit, daß die bei der Zerewitinoffbestimmung gefundenen Resultate zu Fehlschlüssen bei der Konstitutionsaufklärung eines Stoffes führen, wenn sich die primären Reaktionsprodukte zu Verbindungen umlagern, die RH entwickeln bzw. RZ verbrauchen. Wie das Beispiel des 4-Methyl-o-chinondi-acetats (Schema 5 und 6) erkennen ließ, ist auch der *Gesamtverbrauch an metallorganischem Reagens* ($E + V$) nicht immer ein eindeutiges Kriterium für die Konstitutionsaufklärung.

Ein Vergleich verschiedener metallorganischer Verbindungen zeigte, daß *Methyllithium* gegenüber Methylmagnesiumjodid bei der Zerewitinoffbestimmung wegen der größeren Reaktionsfähigkeit bedeutende Vorteile zu bieten hat. *Äthyl-Grignard-Verbindungen* erwiesen sich bei den quantitativen Versuchen als unzureichend: schon bei Konzentrationen unter 0,3-m lagen die Ergebnisse zu tief, möglicherweise durch sterische Hinderung.

Bei $LiAlH_4$ ergab sich, daß dessen Reaktionsweise nicht in allen Fällen der von Grignard-Verbindungen gleichgesetzt werden darf, da bei ersterem an Stelle der Methylgruppe ein Wasserstoff in das Molekül eintritt, der gegebenenfalls in der Folge bei Sekundärreaktionen acid werden kann.

Experimenteller Teil

Apparatives

Es wurde die von *A. Soltys*[7] vorgeschlagene Apparatur verwendet. Da bei Reagenslösungen, die stärker als 0,3-m waren, die übliche Mikrogasbürette mit einem Fassungsvermögen von 7 ml nicht ausreichte, wurde ein *zusätzliches Auffanggefäß* in Form eines 4-Kugelrohres zwischen Gasbürette und Reaktionsgefäß angebracht (vgl. Abb. 2). Die einzelnen Kugeln waren durch Kapillaren miteinander verbunden. Durch darauf angebrachte Eichmarken war das Volumen der einzelnen Kugeln (zirka 5 ml) auf zwei Dezimalen genau festgelegt. Mittels eines Niveaugefäßes, das mit Quecksilber gefüllt war und durch einen Schlauch mit dem 4-Kugelrohr in Verbindung stand, konnten wahlweise eine oder mehrere Kugeln als zusätzliches Gasauffanggefäß geschaltet werden. Das restliche Gasvolumen wurde dann in der Gasbürette der Soltysapparatur gemessen.

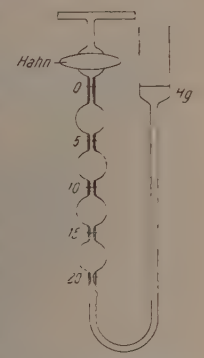


Abb. 2. Zusätzliche Gaspipette für die Soltysapparatur

Bei Verwendung von $LiAlH_4$ in Tetrahydrofuran wurde der gereinigte Stickstoff vor Eintritt in die Apparatur durch eine Waschflasche mit 0,5%iger Lösung von $LiAlH_4$ in Tetrahydrofuran geleitet.

Reagenzien

Darstellung der Reagenslösungen: Diese erfolgte in der von *A. Soltys*[7] beschriebenen Apparatur, die aus einem Veresterungskolben mit Schliffkühler besteht. Während der Darstellung des Reagens wurde stets trockener Stickstoff, von O_2 über Cu bei 500° befreit, durchgeleitet.

Das verwendete Magnesiumband (0,2 Mole) wurde vorher mittels eines Schmiergelpapieres blank gescheuert und zu einer Lösung von 0,1 Mol Alkyljodid bzw. -bromid in 50 ml Di-iso-amyl-äther gegeben und die Reaktion durch Zugabe eines Körnchens Jod in Gang gebracht. Nach Abklingen der Hauptreaktion wurde noch 2 Stunden im N_2-Strom erhitzt und sodann flüchtige Bestandteile durch Evakuieren entfernt. Nach Absitzen der Lösung (zirka 12 Stunden) wurde das Reagens entweder in eine Vorratsflasche oder in die Soltysapparatur übergeführt. Sofern eine geringere Reagenskonzentration erwünscht war, verdünnten wir die Lösung unter Durchleiten von N_2 mit Di-iso-amyl-äther.

Methylmagnesiumjodid: 4,8 g Magnesiumband; 14,2 g Methyljodid.
Methylmagnesiumbromid: 4,8 g Magnesiumband; 9,5 g Methylbromid.
Äthylmagnesiumjodid: 4,8 g Magnesiumband; 15,6 g Äthyljodid.
Äthylmagnesiumbromid: 4,8 g Magnesiumband; 10,9 g Äthylbromid.
Methyllithium: 2,8 g (= 0,4 Mol) Lithiumdraht; 14,2 g (= 0,1 Mol) Methyljodid.

Lithiumaluminiumhydrid (1-n Lösung): Das als Lösungsmittel verwendete Tetrahydrofuran wurde zunächst über KOH gereinigt und schließlich über $LiAlH_4$ abdestilliert. 50 ml davon wurden in den Reaktionskolben nach *Soltys* gegeben, 1 g $LiAlH_4$ dazugefügt und unter Rückfluß gelöst. Nach Absitzen des ausgeschiedenen Niederschlages führten wir die Lösung in die Soltysapparatur über.

Durchführung der Bestimmung

5 mg Probe wurden im Reaktionskölbchen in 0,5 ml Anisol gelöst, das Kölbchen an die Apparatur angeschlossen und 5 Minuten lang Stickstoff durchgeleitet. Nach Absperren des N_2-Stromes stellten wir das Hg-Niveau in der Bürette auf Marke Null und setzten unter Unterdruck eine genau gemessene Menge Reagens (V_R = 0,80 bis 1,00 ml) zu. Nach Schütteln (1 Minute) wurde das entwickelte Volumen abgelesen. Nach Abzug des Blindwertes und V_R ergab sich daraus der akt. H bei 20° ($= E$). Sodann erhitzten wir 1 Minute lang mit kochendem Wasser (Becherglas), kühlten ab und lasen nach 3 Minuten ab (akt. H bei 100°). Nun setzten wir aus der Anilinbürette ein gemessenes Volumen Anilin (V_A = max. 1,00 ml) zu, um das überschüssige Reagens zu zersetzen. Von dem nunmehr abgelesenen Volumen wurde ($V_R + V_A$) abgezogen ($= V_Ü$). $V_Ü$ ist der Menge Reagens äquivalent, die nicht von der Substanz abgebunden wurde. Aus einer analog durchgeführten Gehaltsbestimmung des Reagens ergab sich das Volumen V_G, das der insgesamt zur Verfügung stehenden Menge Reagens äquivalent ist. Die gesuchte, von der Substanz verbrauchte Reagensmenge (V) resultiert, daher aus der Differenz $V_G - V_Ü$ (ausgedrückt in Volumteilen RH).

Zusammenfassung

Bei der Zerewitinoffbestimmung verschiedener Chinolacetate wurden Resultate erhalten, die bezüglich des aktiven Wasserstoffs und des Reagensverbrauches zum Teil von denen verschieden sind, die nach der Konstitutionsformel zu erwarten wären. Die analytischen Resultate finden jedoch ihre Erklärung in den Reaktionsschemata, die von *F. Wessely* und Mitarbeitern auf Grund präparativer Versuche mit Chinolacetaten aufgestellt worden waren.

Bei der Erprobung verschiedener metallorganischer Verbindungen im Rahmen der Zerewitinoffbestimmung fanden wir, daß dem Methyllithium (wegen seiner besonderen Reaktionsfähigkeit) gegenüber den Grignard-Verbindungen der Vorzug zu geben ist. Weiters zeigte sich, daß man mit $LiAlH_4$ nicht immer dieselben analytischen Befunde erwarten darf wie mit Grignard-Verbindungen.

Summary

The Zerewitinoff determination of various quinol actetates yielded results, which in part differed from those expected from the structures with respect to the active hydrogen and the consumption of reagent. However, the analytical findings can be explained by the reaction scheme advanced by *F. Wessely* and his associates on the basis of preparative studies with quinol acetates.

When various metallo-organic compounds were tried within the framework of the Zerewitinoff determination, it was found that methyl lithium (because of its special reactivity) shows advantages over the Grignard compounds. Furthermore, it was shown that the same analytical results may not always be awaited with $LiAlH_4$ as with Grignard compounds.

Résumé

Lors de la détermination de Zerewitinoff de l'hydrogène actif effectuée sur divers acétates de quinols, les résultats correspondant à la consommation de réactif différent en partie de ceux que la formule de constitution permettrait d'attendre. Toutefois, les résultats analytiques trouvent une interprétation par application du schéma réactionnel proposé par *F. Wessely* et ses collaborateurs au cours de leurs recherches sur la préparation des acétates de quinols.

Des essais de la méthode de Zerewitinoff différentes combinaisons organométalliques nous ont montré effectués en employant que le méthyllithium devait être préféré aux réactifs de Grignard du fait de sa grande réactivité.

En outre, il est apparu que l'on ne doit pas toujours attendre des résultats analytiques identiques selon que l'on emploie $LiAlH_4$ ou les réactifs de Grignard.

Literatur

[1] VIII. Mitt.: *F. Wessely* und *E. Zbiral*, Ann. Chem., im Druck.

[2] *F. Wessely, L. Holzer* und *H. Vilcsek*, Mh. Chem. **83**, 1253 (1952).

[3] *F. Wessely* und *J. Kotlan*, Mh. Chem. **84**, 124 (1953).

[4] *F. Wessely, L. Holzer* und *H. Vilcsek*, Mh. Chem. **84**, 655 (1953).

[5] *F. Wessely, L. Holzer, F. Langer, E. Schinzel* und *H. Vilcsek*, Mh. Chem. **86**, 831 (1955).

[6] *O. Polansky, E. Schinzel* und *F. Wessely*, Mh. Chem. **87**, 24 (1956).

[7] *A. Soltys*, Mikrochem. **20**, 107 (1936).

[8] *W. Hückel* und *E. Wilip*, J. prakt. Chem. **156**, 95 (1940).

[9] *F. A. Hochstein*, J. Amer. Chem. Soc. **71**, 305 (1949).

[10] *H. Lieb* und *W. Schöniger*, Mikrochem. **35**, 400 (1950).

[11] *P. W. Mullen*, Modern Gas Analysis. New York: Interscience 1955. S. 108.

[12] *C. E. Entemann*, jr. und *J. R. Johnson*, J. Amer. Chem. Soc. **55**, 2900 (1933).

[13] *Landolt-Börnstein*, Physikalisch-chemische Tabellen, 5., umgearb. u. verm. Aufl., II. Bd. Berlin: J. Springer. 1923. S. 1039 und 1041.

Mikroanalytisches Laboratorium der Pharmazeutischen Abteilung der CIBA A. G., Basel, Schweiz

Die Mikro-Molekulargewichtsbestimmung gelöster Substanzen durch direkte Dampfdruckmessungen*

(Tensimetrische Methode)

Von

H. Gysel und **K. Hamberger**

Mit 7 Abbildungen

(Eingegangen am 6. Oktober 1956)

Die Molekulargewichtsbestimmungen gehören zu denjenigen Analysen, die bei der Erforschung unbekannter chemischer Verbindungen, besonders der Naturstoffe, von größter Bedeutung sind. Es gibt mancherlei Verfahren, die zur Ermittlung des Molekulargewichtes dienen, so die ebullioskopischen, die kryoskopischen, die osmotischen Methoden, die Dampfdichtebestimmungen unter normalem und vermindertem Druck, die Molekulargewichtsbestimmung durch Messung der Lichtabsorption, die röntgenometrische Bestimmung, die tensimetrische Bestimmung, usw.

Merkwürdigerweise ist die Weiterentwicklung der Molekulargewichtsbestimmungsmethode mit Hilfe *direkter* Dampfdruckmessungen, also der tensimetrischen Methode, bis anhin versäumt worden. Es existieren über diese Bestimmungsart in der ganzen einschlägigen Literatur nur wenige Publikationen. Für das Arbeiten im Halbmikro- oder Mikromaßstab ist die tensimetrische Methode überhaupt noch nicht verwendet worden. Dabei halten wir diese Methode als für die Weiterentwicklung recht geeignet.

Das Problem der Molekulargewichtsbestimmung ist für das moderne Mikrolaboratorium noch nicht befriedigend gelöst. Noch ist die weitaus häufigst verwendete Mikromethode diejenige von *Rast*. Deren Vorteile sind bemerkenswert. Man benötigt nur kleine Substanzmengen (0,1 bis 1 mg). Zur Bestimmung genügt ein guter Schmelzpunktsapparat, wie

* Herrn Prof. Dr. *Hans Lieb* zum 70. Geburtstag gewidmet.

er in jedem Laboratorium verwendet wird. Manuell stellt die Methode keine besonderen Ansprüche an den Analytiker, sie ist denkbar einfach. Ihre Nachteile liegen

a) in der oft ungenügenden Löslichkeit der zu untersuchenden Substanz in Kampfer oder dessen Ersatzstoffen, wie Exalton, Borneol, Bornylbromid, usw.;

b) in der Temperaturempfindlichkeit mancher Analysensubstanzen.

In unserem mikroanalytischen Laboratorium können höchstens bei einem Drittel der eingehenden Analysenpräparate die Molekulargewichtsbestimmungen nach *Rast* mit Erfolg durchgeführt werden. Auf andere Methoden der Molekulargewichtsbestimmungen können wir hier nicht eingehen, machen aber auf das Sammelreferat von *Sobotka*[1] aufmerksam.

Je nach der Art der Molekulargewichtsbestimmungen müssen verschiedene Forderungen an die zu analysierende Substanz gestellt werden, um einigermaßen zuverlässige und genaue Resultate zu erhalten, oder um die Bestimmung überhaupt durchführen zu können. Die wichtigsten Voraussetzungen sind: Löslichkeit, thermische Beständigkeit, Verdampfbarkeit.

Von einer neuen und guten Molekulargewichtsbestimmungsmethode erwarten wir: einfache und leicht zu handhabende Apparatur, Genauigkeit, Leistungsfähigkeit, großen Anwendungsbereich; es sollen nahezu alle Analysensubstanzen analysiert werden können. Es müssen auch Molekulargewichte von 500 bis 1000 bestimmt werden können.

Die vorliegende Methode entspricht diesen Erwartungen. Sie kann viel universeller angewendet werden als alle anderen bekannten Methoden und bedeutet einen bemerkenswerten Fortschritt. Es sind nur noch wenige Analysensubstanzen, deren Molekulargewicht auf diese Art nicht bestimmt werden kann. Wir haben von vielen hundert Präparaten, deren Molekulargewicht weniger als 1000 betrug, bisher nur zirka 3% nicht mit dem gewünschten Erfolg analysieren können.

Vor bald 100 Jahren beobachtete *Müllner*[2], daß der Dampfdruck von Wasser und anderen Lösungsmitteln durch gelöste Substanzen erniedrigt wird, und daß diese Dampfdruckerniedrigung „im großen und ganzen" der gelösten Substanzmenge proportional ist. 30 Jahre später hat *Raoult*[3] die Beobachtungen *Müllners* weiter untersucht und mit seinen Forschungen die Basis für die ebullioskopischen und kryoskopischen Methoden der Molekulargewichtsbestimmung geschaffen.

Die *direkte* Messung der Dampfdruckerniedrigung von Lösungen, um diese zur Molekulargewichtsbestimmung zu verwerten, gelang erstmals *Alan W. C. Menzies*[4]. Seine Apparatur wird mit den Abb. 1*a* und 1*b* gezeigt. Die apparativen Voraussetzungen sind für diese Differentialmethode sehr einfach. Es ist schade, daß diese einfache und gute Methode nicht im Mikromaßstab durchführbar ist.

Später bemühten sich auch *A. Stock* und *E. Pohland*[5] wie auch *H. Reihlen* und *K. Th. Nestle*[6] um die tensimetrische Molekulargewichtsbestimmung.

Die Idee unserer, auf der direkten Dampfdruckmessung beruhenden Methode ist die Folgende:

Es werden jeweils gleiche Mengen (0.1 oder 0,05 ml) Lösungsmittel und einer 3- bis 10%igen Lösung der zu untersuchenden Substanz in

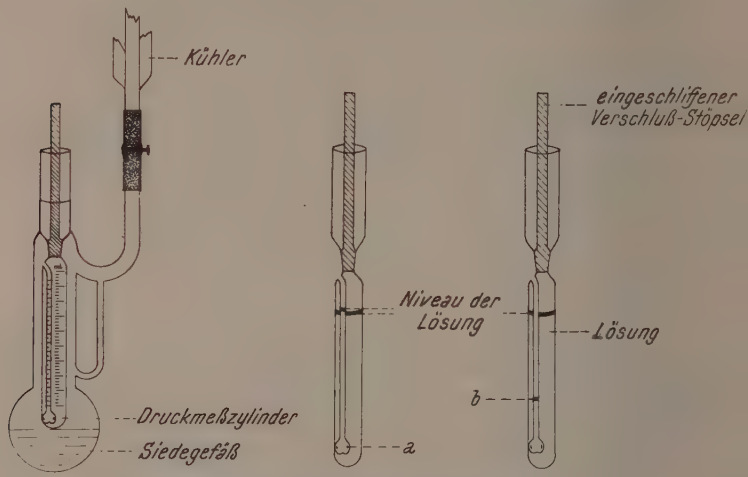


Abb. 1 *a* und *b*. Apparat zur Bestimmung des Molekulargewichtes nach *Menzies*
a feine Poren, *b* Niveau der Lösung während der Messung

je eine der Flüssigkeitskammern der Doppelapparatur (s. Abb. 3 und 5) eingebracht und mit Quecksilber luftfrei abgeschlossen. Die beiden Flüssigkeitskammern taucht man in ein Flüssigkeitsbad (Wasserbad), dessen Temperatur durch ein Kontaktthermometer-Relais-System völlig konstant gehalten wird. Die sich einstellenden Dampfdrucke werden mit Hilfe von Quecksilbermanometern gemessen.

Die Versuchstemperaturen werden so gewählt, daß sie wesentlich über dem Siedepunkt der verwendeten Lösungsmittel liegen. Zwar erhält man auf diese Weise recht hohe Dampfdrucke von 1,5 bis 2,5 Atmosphären, aber auch recht bemerkenswerte Dampfdruckdifferenzen zwischen Lösungsmittel und Lösung. Die Dampfdruckunterschiede haben meistens eine Größe von 50 bis 200 mm Hg und können sehr gut auf $\pm$ 1 mm abgelesen werden.

Eine weitere Steigerung der Dampfdruckdifferenzen wird dadurch erreicht, daß die Konzentration der Lösung während der Messung durch das Verdampfen eines Teiles des Lösungsmittels absichtlich vergrößert wird.

Durch exaktes Einhalten der Versuchsbedingungen sind die erzielten Effekte genau reproduzierbar. Selbstverständlich werden bei der Ermittlung der Lösungsmittelkonstanten die genau gleichen Bedingungen eingehalten.

Damit die Dampfdruckmessungen unabhängig vom Luftdruck bzw. Barometerstand sind, werden die oberen Enden der beiden Quecksilbermanometer (bzw. Meßkapillaren) an eine Hochvakuumpumpe angeschlossen.

Die große Anzahl von Lösungsmitteln, die z. B. zwischen 30 und 85° C sieden und deren Dampfdruck wir ohne weiteres messen können, geben der Methode eine sehr große Anwendungsbreite. Es wird sich nahezu immer ein Lösungsmittel finden, das auch eine schwerlösliche Substanz zu mindestens 3% zu lösen vermag.

Berechnung

Nach dem Gesetz von *Raoult* ist:

$$\frac{p}{\Delta p} = \frac{n_1}{n_2} \tag{1}$$

p = Dampfdruck des Lösungsmittels,
Δp = Dampfdruckerniedrigung,
n_1 = Mole Lösungsmittel,
n_2 = Mole gelöster Substanz.

Nun ist

$$n_1 = \frac{G_L}{M_L} \text{ und } n_2 = \frac{G_S}{M_S},$$

wobei

G_S = Gewicht der Substanz,
M_S = Molekulargewicht der Substanz,
G_L = Gewicht des Lösungsmittels,
M_L = Molekulargewicht des Lösungsmittels.

Daher

$$p = \frac{G_S}{M_S} \cdot \frac{M_L \cdot p}{G_L}. \tag{2}$$

Da nun die Größe $(M_L \cdot p)$ bei allen analogen Versuchen, also mit gleichem Lösungsmittel, gleicher Temperatur, gleichem Druck bzw. gleichem Vakuum gleich groß ist, können wir diese Größe als Konstante einsetzen.

$$M_L \cdot p = K'.$$

K' ist von der Größenordnung 50000 bis 200000. Setzen wir der Einfachheit halber

$$K' = 1000 \cdot K,$$

so ergibt sich folgende Formel zur Berechnung des Molekulargewichtes:

$$M_S = \frac{G_S}{G_L} \cdot \frac{K}{\Delta p} \cdot 1000, \tag{3}$$

wobei G_S und G_L in gleichen Einheiten und Δp in Millimeter gemessen wird.

Für die Ermittlung der Konstante K gilt dann die Formel:

$$K = \frac{M_S}{G_S} \cdot \frac{G_L}{1000} \cdot \Delta p. \tag{4}$$

Wir führen die Messungen, je nach Substanz und Lösungsmittel, zwischen 60 und 96° C aus. Für diese Temperatur kann man ein Wasserbad benützen. Dabei sind die Konstanten schon von beachtlicher Größe. Bei 96° Badtemperatur und guter Durchmischung des Wasserbades steigen noch keine Dampfblasen auf, die die Ursache von Niveauschwankungen im Quecksilbermanometer sein könnten. Die Lösungen zeigen im Vergleich mit den Lösungsmitteln eine Dampfdruckerniedrigung von zirka 20 bis 200 mm Hg.

Tabelle 1. Für die Messungen benützte Lösungsmittel und deren Konstante K

Lösungsmittel	°C Arbeitstemperatur	K	Dampfdruck in mm Hg
Aceton	83	110	1765
Chloroform	83	140	1760
Methylenchlorid	64	100	1758
Äther	60	145	1750
Methylalkohol	87	89	1775
Äthylalkohol	96	70	1515
Petroläther	84	128	1785
Tetrachlorkohlenstoff	88	120	1050
Äthylenchlorid	96	90	1183
Benzol	96	50	1228
Pentan	62	91	1787

Bis jetzt haben wir die drei Lösungsmittel: Chloroform, Aceton und Methylenchlorid als die geeignetsten für unsere Molekulargewichtsbestimmung gefunden.

Die Apparaturen zur Bestimmung des Molekulargewichtes

Die eigentliche Meßapparatur

Die Abb. 2 zeigt eine einzelne Meßapparatur. Die Länge der Meßröhre *1* ist zirka 2200 mm. Sie dürfte genügen, ist es doch recht heikel, bei Drucken von mehr als 2000 mm Hg, alle Schliffe dicht zu halten.

Die beiden kombinierten Meßapparaturen zur gleichzeitigen Messung der Dampfdrucke des Lösungsmittels und der Lösung werden durch die Abb. 3 dargestellt. Beide Apparaturen sollen möglichst genau gleiches Innenvolumen besitzen.

Die speziellen Absperrhähne und Verschlußstücke zeigt die Abb. 4. Der Kugelschliffverschluß *B* genügt sogar für Messungen mit Chloroform, obwohl dieses lösend auf das Siliconfett einwirkt. Die Abb. 5 zeigt die schematische Darstellung der ganzen Apparatur.

Hilfsgeräte: Als wesentlichstes Hilfsgerät wird ein Thermomix verwendet*. Dieses Heiz- und Mischgerät besteht aus Tauchsieder, Umlaufpumpe, Mischpropeller, Kontaktthermometer und Relais. Das Wasserbad faßt rund 5 l.

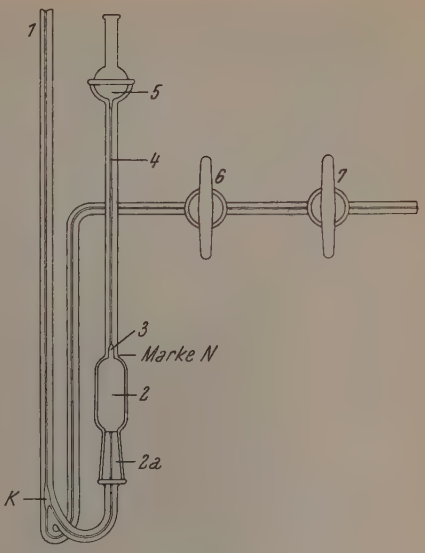


Abb. 2. *1* = Die Meßröhre (Kapillare mit einem Lumen von 1 mm), *2* = Dampfkammer mit Schliff (*2a*), *3* = Flüssigkeitskammer, *4* = Einfüllkapillare (0,5 mm lichte Weite), *5* = Verschlußstück mit Kugelschliff, wobei der Kugelbecher als Einfülltrichter dient, *6* und *7* = Absperrhähne (siehe Abb. 4), *N* = Einfüllmarke für die Lösung bzw. das Lösungsmittel

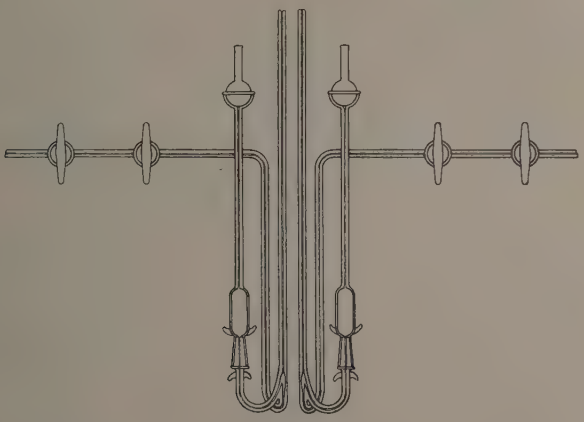


Abb. 3

* Ein Produkt der Firma B. Braun, Melsungen (Abt. Apparatebau). In der Schweiz ist die Firma vertreten durch Fribos, Basel 20, Sevogelstraße 36.

Bemerkungen zur Apparatur: Es ist sehr wichtig, das Wasserbad gut zu durchmischen: Alle Schliffe müssen einwandfrei geschliffen sein. Die Meßröhren sind aus Kapillaren möglichst gleichmäßiger Dimension anzufertigen.

Die Abb. 3, 5, 6, 7 zeigen die beiden einzelnen Geräte zum Messen der Dampfdrucke. Links messen wir immer den Dampfdruck des Lösungsmittels, rechts denjenigen der Lösung.

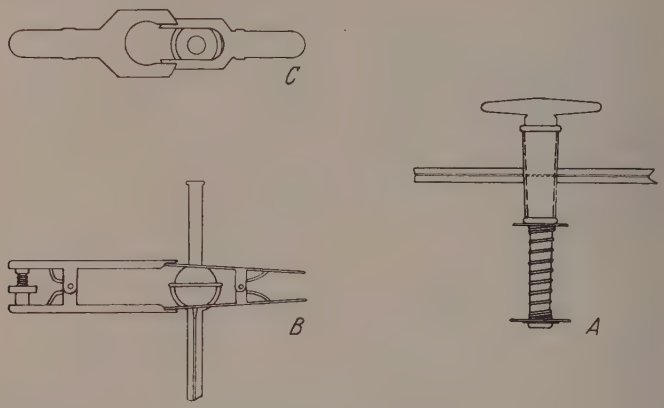


Abb. 4
A = Absperrhahn mit spezieller Sicherung, *B* = Verschluß durch Kugelschliff. Sicherung des Kugelschliffstöpsels mittels zweier Spannfedern, *C* = Aufsicht von *B*

Betrachten wir ein einzelnes Meßgerät genauer (Abb. 2), so sehen wir ganz links das stark verkürzt gezeichnete, aber 2200 mm lange Meßrohr bzw. die Meßkapillare. Diese hat ein Lumen von 1 mm und teilt sich unten in zwei Teile. Die Verzweigungsstelle zeigt eine kleine pflaumenförmige Erweiterung *K* von zirka 3 mm lichter Weite. Diese absichtlich so geformte Erweiterung verhindert ein Verbleiben von Luftblasen an dieser Stelle, wenn man das Meßrohr mit Quecksilber füllt.

Von der Abzweigstelle ausgehend, verfolgen wir das dem Meßrohr näherliegende Zweigstück. Es ist dies das Quecksilber-Einfüllrohr und führt zur Quecksilber-Vorratsflasche. Im waagrechten Teil dieses Rohres befinden sich zwei gut eingeschliffene, spezielle Absperrhähne [Abb. 2, 3, (4), 5, Nr. *6* und *7*]. Es war notwendig, zwei solcher Absperrhähne anzubringen, damit sie den großen Druck während der Messungen auszuhalten vermögen, ohne daß eine undichte Stelle einen Druckverlust verursacht. Die Konstruktion der Absperrhähne ist in der Abb. 4*a* dargestellt.

Das zweite Abzweigstück (s. Abb. 2) führt zum Druckgefäß mit der Dampfkammer. Diese liegt in einem abnehmbaren Teilstück der Meß-

apparatur und ist mittels eines guten Schliffes mit dem feststehenden Teil verbunden. Der abnehmbare Teil trägt dabei die Schliffhülse, der untere feste Teil den Schliffkern. Der Schliff selbst wurde recht lang gewählt, um jede Undichtigkeit auszuschließen. Am oberen Ende der Dampfkammer, vor der Kapillare, ist eine Erweiterung von zirka 10 bis 12 mm Länge und zirka 2 bis 3 mm lichter Weite (s. Abb. 2, Nr. *3*). Dies ist die Flüssigkeitskammer, der Auffangraum der Lösung bzw. des Lösungsmittels. Dort befindet sich auch die Einfüllmarke *N*. Von dieser Erweiterung aus geht nun die 0,5-mm-Einfüllkapillare zum Becher des Kugelschliffverschlusses. Da in den Meßgeräten ein bemerkenswerter Druck herrscht (wir arbeiten ja bei Temperaturen über dem normalen Siedepunkt der Flüssigkeiten, zum Teil also mit mehr als 2 Atmosphären), müssen alle Hähne und Schliffe absolut dicht sein. Der Kugelschliff beim Druckgefäß hat sich als sehr vorteilhaft erwiesen, muß aber durch zwei Spezialklammern, von denen die eine die Wirkung der anderen verstärkt, festgehalten werden (s. Abb. 4, *B* und *C*). Der Kugelschliff wird mit Siliconfett gedichtet.

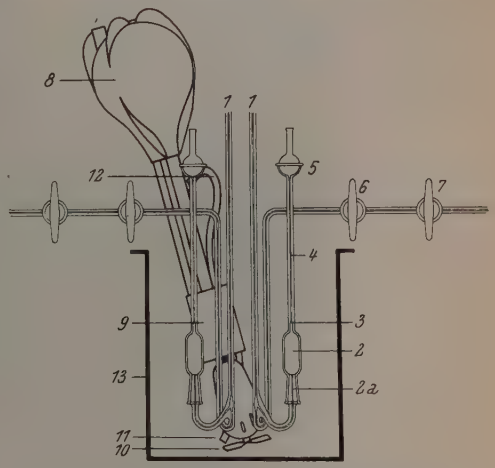


Abb. 5. *8* = Thermomix, Misch- und Heizapparat, *9* = Tauchsieder, Teil des Thermomix, *10* = Mischpropeller des Thermomix, *11* = Schlauchende des Umlaufmischers des Thermomix, *12* = Schlauchstück des Umlaufmischers, *13* = Wasserbad. Nicht eingezeichnet ist das Kontaktthermometer

Ausführung der Bestimmung

Die Einwaage. Je nach der Löslichkeit der vorhandenen Substanz wägen wir (3 bis) 5 bis 15 mg davon in ein 0,5-ml-Maßkölbchen ein. Dann geben wir z. B. 0,1 ml des Lösungsmittels dazu und wägen auch dieses. Die Substanz wird nun gelöst, wenn notwendig unter Erwärmen, Abkühlen und Nachwägen.

Das Einfüllen. Diese Manipulation ist nicht besonders heikel. Nach kurzer Übung ist es ein leichtes, das Lösungsmittel oder die Lösung so in die Flüssigkeitskammer zu bringen, daß keine Luftblase in das System gerät. Zuerst fetten wir den unteren Schliff des gut gereinigten Druckgefäßes. Dann füllen wir das System mit Quecksilber, sobald wir das

Druckgefäß aufgesetzt und mit den Federn gesichert haben. Jetzt öffnen wir die beiden Hähne (Abb. 2, Nr. *6* und *7*) bei hochgestellter Quecksilberbirne und lassen das Quecksilber in die Dampfkammer, die Flüssigkeitskammer und durch die Einfüllkapillare fließen. Sobald im

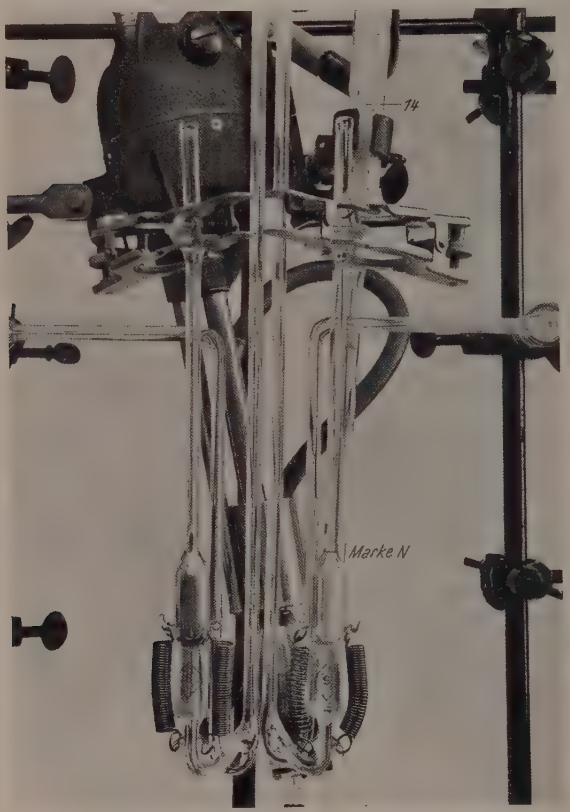


Abb. 6. Detailaufnahme der Apparatur:
14 = Kontaktthermometer

Kugelschliffbecher ein stecknadelkopfgroßer Quecksilbertropfen erscheint, schließt man den Hahn *7* (Abb. 2) und stellt die Quecksilberbirne wieder hinunter. Jetzt gießt man die Lösung in den Kugelschliffbecher, der als Einfülltrichter verwendet wird. Stehen größere Mengen Lösung zur Verfügung, dann gibt man mit Hilfe einer Pipette (z. B. einer Blutzuckerpipette) 0,1 ml davon in den Kugelbecher, öffnet sofort wegen der Verdunstungsgefahr den Hahn *7* und läßt die Lösung bzw. das Lösungsmittel

in die Flüssigkeitskammer fließen. Sobald die Flüssigkeit durch die Einfüllkapillare bis zur Marke *N* (Abb. 2) geflossen ist, geben wir rasch zirka 0,5 ml Quecksilber in den Kugelbecher und lassen durch Öffnen des Hahnes *7* auch vom Quecksilber so lange in die Einfüllkapillare

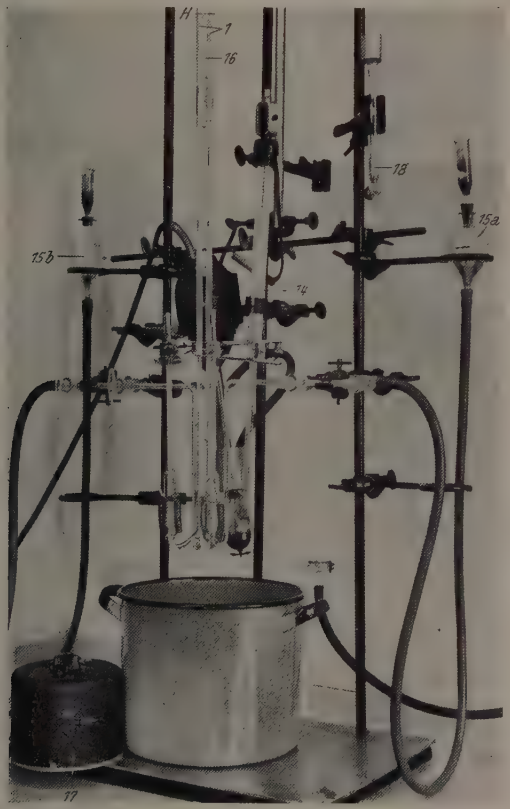


Abb. 7. Gesamtaufnahme der Apparatur:
15 a und *15 b* = Quecksilbervorratsgefäße, *14* = Kontaktthermometer, *1* = Die beiden Meßröhren mit den Einfüllmarken *H*, *16* = Meßstab mit Millimeterskala, *17* = Relais für das Heiz-Misch-Aggregat, *18* = Kleines Quecksilbervorratsgefäß mit Hahn. Es dient dazu, die Lösungen nach dem Einfüllen mit Quecksilber zu überschichten

fließen, bis es beginnt, durch die Flüssigkeitskammer zu tropfen. Nun schließt man den Hahn *7* und drückt den schwach mit Silicon gefetteten Kugelschliffstopfen in den Kugelschliffbecher, wobei das restliche Quecksilber weggedrückt wird. Dieses kann leicht in einem flachen Becken, das als Unterlage dient, aufgefangen werden. Der Stopfen wird mit den

beiden Spezialklammern stark in den Becher gedrückt. Jetzt hebt man die Quecksilbervorratsflasche, öffnet wieder den Hahn *7* und läßt das Quecksilber im Meßrohr bis zur Marke *H* (Abb. 7) fließen. Wir tun das, damit die Flüssigkeit im Druckgefäß bereits vor Beginn des Versuches unter Druck ist. (Die Marke *H* ist zirka 800 mm über den Dampfkammern angebracht, so daß der Anfangsdruck ungefähr einer Atmosphäre entspricht.) Wir erreichen damit, daß die Dampfblase in der Dampfkammer nicht zu groß wird. Nach dem Hahn *7* wird auch der Hahn *6* geschlossen.

Auf diese Art und Weise füllen wir nun die beiden Meßapparaturen luftfrei. In die linke bringen wir das Lösungsmittel, in die rechte die Lösung.

Durchführung der Messung

Nachdem bei den Meßgeräten die Flüssigkeiten eingefüllt, alle Hähne geschlossen und die Quecksilbersäule eingestellt sind, bringen wir die Apparatur in das bereits vorgewärmte Wasserbad. Da wir unabhängig vom Luftdruck bzw. Barometerstand sein wollen, schalten wir am oberen Ende der Meßkapillare bzw. des Quecksilbermanometers die Hochvakuumpumpe an, und zwar gleich nach dem Einstellen des Quecksilberniveaus auf die Marke *H*.

Da die ganze Apparatur fest montiert ist, heben wir das Wasserbad so weit, bis sich die Dampfkammer des Druckgefäßes zirka 50 mm unter der Wasseroberfläche befindet. Dann wird der Thermomix eingeschaltet und das Bad auf die gewünschte Temperatur gebracht. Die Leistung des Tauchsieders ist nicht so groß, daß wir am Anfang die Meßtemperatur mit der notwendigen Geschwindigkeit erreichen. Wir helfen dann mit Bunsenbrennern nach. Nach dem Erreichen der Meßtemperatur messen wir provisorisch den Quecksilberstand und warten 3 Minuten, um schließlich die definitive Ablesung zu machen.

Da die beiden Meßgeräte und besonders die beiden Dampfkammern sehr nahe beieinander sind, unterliegen sie den genau gleichen physikalischen Einflüssen. Zwischen den beiden Meßkapillaren haben wir den Meßstab eingeklemmt. Dieser ist nichts anderes als ein mit Millimeterpapier überzogener Glasstab. Die Druckdifferenzen können damit sehr leicht gemessen werden.

Bei der Messung selbst bilden sich Dampfblasen, die beim Abkühlen der Druckgefäße wieder nahezu verschwinden. Bleiben aber größere Blasen zurück, so ist zu kontrollieren, ob sich die Substanz nicht zersetzt hat oder ob das Lösungsmittel vor der Benutzung genügend ausgekocht wurde.

Nach der Messung schalten wir die Hochvakuumpumpe und den Thermomix ab, entfernen das Wasserbad und tauchen die Apparatur

in ein Kaltwasserbad, bis der Quecksilberfaden in der Meßkapillare wieder auf die Marke *H* gesunken ist. Dann werden die Klammern entfernt und der Kugelschliff geöffnet. Die Lösung und das mit der Lösung verunreinigte Quecksilber läßt man in ein Becherglas laufen. Wertvolles Analysenmaterial kann somit leicht zurückgewonnen werden.

Reinigung der Apparatur

Wenn die Messungen beendet sind, muß das Druckgefäß tadellos gereinigt werden. Zuerst reinigt man mit einem Lappen die Schliffe und reibt das Siliconfett weg, dann wäscht man das Gefäß mit dem gleichen Lösungsmittel, mit dem die Bestimmung durchgeführt wurde und anschließend mit Alkohol und Chloroform. Letzteres löst die letzten Spuren des Siliconfettes. Das Druckgefäß wird dann getrocknet.

Den übrigen festen Teil des Meßgerätes reinigt man, indem man etwas Quecksilber durchlaufen läßt, das man in einem Becherglas auffängt.

Analysenbeispiel

Substanz: p-Aminobenzoesäure-äthylester
Einwaagen: 16,56 mg Substanz
146,8 mg Aceton

Gefundene Drucke:	1. Best.: Aceton	1767 mm	2. Best.:	1767 mm
	1. Best.: Lösung	1692 mm	2. Best.:	1691 mm
Differenz:	1. Best.:	75 mm	2. Best.:	76 mm

Konstante für Aceton: 110
Mol.-Gewicht gefunden: 1. Best.: 165,5 2. Best.: 163,5
Mol.-Gewicht berechnet: 165,2

Bemerkungen

Als Lösungsmittel verwendet man am besten frisch dest. Flüssigkeiten. Stehen solche nicht zur Verfügung, dann koche man sie auf, um eventuell darin gelöste Gase auszutreiben.

Die beiden Meßgeräte sind vor dem ersten Gebrauch zu kontrollieren, ob sie auch nahezu das gleiche Innenvolumen besitzen. Besonders wichtig ist das in der Nähe der Meßtemperatur. Zu diesem Zwecke füllt man die Apparatur mit Quecksilber, bringt aber keine andere Flüssigkeit in die Flüssigkeitskammern. Erhitzt man nun das Druckgefäß, so müssen sich die beiden Quecksilbermenisken in den Meßröhren stets auf gleicher Höhe befinden. Praktisch ist das nicht immer der Fall, meistens differieren sie um 1 bis 2 mm, die dann bei den Bestimmungen verrechnet werden. Es empfiehlt sich, die Apparatur auch so zu kontrollieren, daß man in beide Flüssigkeitskammern das gleiche Lösungsmittel bringt.

Für die Messungen können wir kein siedendes Wasserbad benützen, weil durch die Dampfblasen Wärmedifferenzen auftreten, die Schwankungen der Quecksilbermenisken zur Folge haben.

An Stelle des Kugelschliffverschlusses darf kein gewöhnlicher Hahn angebracht werden. Solche Hähne sind bei so hohen Drücken und Temperaturen immer wieder undicht.

Der an die Dampfkammer angeschlossene Schliff darf nicht mit Flüssigkeitsdämpfen, sondern nur mit dem Quecksilber in Berührung kommen, da er sonst undicht wird.

Wir machen täglich eine Kontrollanalyse zur Bestimmung der „Tagesunstimmigkeit". Das zu tun, ist auch empfehlenswert, wenn man neue, größere Serien in Untersuchung nimmt.

Es besteht die Möglichkeit, daß wir noch andere, besser geeignete Lösungsmittel finden mit besseren Löslichkeitseigenschaften, höheren Depressionskonstanten und tieferem Siedepunkt.

Die Genauigkeit der Methode

Wir erwähnten, daß die Dampfdruckerniedrigungen bei unseren Lösungen meistens eine Größe von 20 bis 150 mm Hg betragen. Da nun bei guten Bedingungen die Ablesegenauigkeit ausgezeichnet ist, hängt der Ablesefehler vom ruhigen Stand des Quecksilbermeniskus ab. Dieser schwankt meistens um weniger als 1 mm. Daher ist die vorliegende Methode erfreulich genau.

Die Fehlergrenze der Methode hängt von der Größe des Molekulargewichtes ab. Beim überwiegenden Teil der Molekulargewichtsbestimmungen darf mit folgenden Fehlergrenzen gerechnet werden:

2 bis 6% bei Mol.-Gewichten von 100 bis 300,
4 bis 10% bei Mol.-Gewichten von 300 bis 500,
5 bis 15% bei Mol.-Gewichten bis 1000.

Da sich Substanzen mit hohen Molekulargewichten oft viel schlechter lösen als solche mit niederen, genaue Molekulargewichtsbestimmungen bei Substanzen mit höheren Molekulargewichten aber wesentlich größere Einwaagen voraussetzen, treten bei diesen Bestimmungen mit zunehmendem Molekulargewicht zusätzliche Schwierigkeiten auf, die die Genauigkeit der Analysen progressiv herabsetzen.

Die Leistungsfähigkeit der Methode

Für Einzelbestimmungen benötigen wir zirka 2 Stunden Arbeit, da man auch in diesem Falle Kontrollanalysen einschalten muß. Bei Serienanalysen benötigt man für eine einzelne Bestimmung viel weniger Zeit, das heißt knapp eine $^1/_2$ Stunde. Die Methode ist also bemerkenswert leistungsfähig.

Die Vorteile der Methode

1. Die Methode ist nahezu universell brauchbar. Die einzige Bedingung ist, daß sich die Analysensubstanz in einem nicht zu hoch siedenden Lösungsmittel möglichst zu 3 bis 5% löst. (Siedepunkt des Lösungsmittel zirka 30 bis 85° C.)

2. Die Methode ist apparativ und manuell so einfach, daß auch Hilfskräfte die Bestimmungen durchführen können.

3. Die Methode ist so leistungsfähig, daß bei Serienanalysen die einzelne Bestimmung leicht innert 30 Minuten durchgeführt werden kann.

4. Die Genauigkeit der Methode ist beachtlich, hängt aber von der Größe des Molekulargewichtes der Substanz ab. Die Fehlergrenze beträgt zirka 5 bis 8 (bis 15)%.

5. Die Methode ist noch entwicklungsfähig. Wir sind daran, noch

a) mit neuen, niedrig siedenden Lösungsmitteln (Siedepunkt 30 bis 90° C) und tiefsiedenden Lösungsmitteln (Siedepunkt unter 30° C) zu arbeiten;

b) eine Differentialmethode auszuarbeiten.

6. Wir benötigen 3 bis 10 mg Substanz, bei sehr hohen Molekulargewichten 15 mg. Ist das Analysenmaterial wertvoll, so kann es zurückgewonnen werden.

Die Nachteile der Methode sind technischer Art:

1. Die langen Meßröhren zwingen den Analytiker, auf den Arbeitstisch zu steigen, um die Ablesungen vorzunehmen. Mit der Differentialmethode wird diese Unannehmlichkeit behoben werden.

2. Das Wechseln des Heiß- und Kaltwasserbades ist nicht besonders leicht (5-l-Wasserbad), kann aber durch mechanische Einrichtungen erleichtert werden.

Zusammenfassung

Es wird eine neue Methode beschrieben, die es ermöglicht, Mikro-Molekulargewichtsbestimmungen gelöster Substanzen auszuführen. Die Methode beruht auf der *direkten* Dampfdruckbestimmung und ist von allgemeiner Anwendbarkeit, genau und leistungsfähig.

Summary

A new micro method is described for the molecular weight determinations of dissolved materials. The method is based on the direct determination of the vapor pressure. The method is precise and serviceable and of general applicability.

Résumé

On décrit une nouvelle méthode de micro-détermination du poids moléculaire de substances dissoutes. Elle se fonde sur la mesure directe de la tension de vapeur. Elle est d'application générale, exacte et rapide.

Literatur

[1] *Martha Sobotka*, Mikrochem. **32**, 49 (1944).
[2] *A. Müllner*, Ann. Physik **103**, 529 (1858); **105**, 478 (1858).
[3] *F. M. Raoult*, C. r. acad. sci., Paris **103**, 1125 (1886); **104**, 976 (1887); **104**, 1430 (1887); **107**, 442 (1888); Z. physik. Chem. **2**, 353 (1888); Ann. chim. phys. [6], **15**, 375 (1888).
[4] *A. W. C. Menzies*, Z. physik. Chem. **76**, 231 (1911).
[5] *A. Stock* und *E. Pohland*, Ber. dtsch. chem. Ges. **58**, 657 (1925).
[6] *H. Reihlen* und *K. Th. Nestle*, Ber. dtsch. chem. Ges. **59**, 1159 (1926).

Département de Microchimie de l'Université de Bruxelles

Récents progrès dans la chromatographie quantitative sur papier*

Par

A. Lacourt

Avec 1 figure

(Reçu le 3 décembre 1956)

La carence en microméthodes quantitatives sensibles, reproductibles et rapides contingente le développement des sciences s'occupant du monde vivant[1] pour lesquelles les méthodes classiques sont insuffisantes. A cause de l'ordre de grandeur des quantités à doser et à manipuler[2–4], les méthodes d'analyse globale ne sont utilisables que qualitativement. La chromatographie sur papier s'est révélée très féconde aussi bien dans le domaine minéral qu'organique pour séparer ou identifier des ultra microquantités, malgré l'absence de toute base théorique capable de prévoir l'allure de nouvelles séparations ou localisation[5]. En combinant la chromatographie sur papier à l'analyse à la touche, *Pollard* et *McOmie* ont tout au plus élaboré une ultra microméthode d'analyse minérale sur papier, permettant d'identifier en 3 heures les 24 éléments d'une solution chlorhydrique ou nitrique 2 N[6]. Cette technique est purement *qualitative*, les taches chevauchent le plus souvent, ce qui exclut leur dosage.

La chromatographie quantitative sur papier a progressé beaucoup plus lentement parce qu'elle exige l'obtention de taches individuelles chromatographiées *dosables* et que ceci implique l'étude du comportement chromatographique de chaque élément et de ses réactions à l'égard de facteurs d'interférence. En l'absence de toute théorie, ce comportement doit s'étudier par voie expérimentale, en serrant d'aussi près que possible les résultats par des moyens quantitatifs.

Un certain nombre de facteurs d'interférence ont été expérimentés déjà de cette manière. Cette étude montre que le comportement de

* A M. le Professeur de l'Université Dr. *Hans Lieb* à l'occasion de son 70ème anniversaire.

chaque élément à leur égard est différent. Il est donc necessaire de commencer l'étude de la chromatographie quantitative par l'étude de solutions simples.

La solution aqueuse de l'élément envisagé, déposée sur le papier peut être *développée humide ou sèche* selon les cas. Pour certains éléments, comme l'*aluminium*, le *titane*, le *chrome*, le *tungstène*, le *vanadium* etc. la *dessiccation* de la prise est nécessaire[7] car le développement d'une prise humide conduit à des *taches diffuses*.

Tableau I. Effet du traitement de la prise sur la migration de l'élément

Elément*	Saturant	Développant	Développement de la tache			
			sèche		humide	
			A/C	B/C	A/C	B/C
Zinc	Acétone	2-butanone 85 ml benzène 10 ml HCl conc. 5 ml	au dépôt		0,70	1,00
	Acétone	benzène 30 ml ac. acétique 70 ml	au dépôt		0,68	1,00
	Acétone 99 ml HCl conc. 1 ml	benzène 10 ml alc. propyl. 90 ml	au dépôt		0,80	1,00
Cadmium	2-butanone	benzène 40 ml alc. méthyl. 60 ml	au dépôt		0,85	1,00**
	Acétone	dioxane	au dépôt		0,25	0,50
Bore	Acétone 50 ml Benzène 50 ml	acétone 50 ml benzène 50 ml	0,06	0,40	0,00	0,14

* 10 μg d'élément sous forme de nitrate en solution nitrique (1% *v/v* d'acide nitrique, $d = 1{,}42$).

** Les mêmes valeurs ont été trouvées pour le zinc, le plomb et l'uranium dans ces mêmes conditions expérimentales.

Pour d'autres éléments, comme *le bore*, *le zinc*, *le cadmimum*, *le plomb*[7], *l'uranium*, le développement de la prise doit se faire *sans dessiccation* préalable. Dans ces cas, la dessiccation de la prise arrête la migration de l'élément ou bien l'entrave partiellement, ou donne lieu à deux taches séparées l'une au dépôt, et l'autre à mi-chemin — selon le degré de dessiccation pratiqué (Tableau I).

Il est évident que dans ces cas, l'eau contenue dans le *volume de solution prélevée* joue un rôle capital dans l'obtention du chromatogramme, à tel point, qu'il existe des éléments dont le développement est si sensible à l'humidité que les taches chromatographiées varient en position et en dimension dans des mesures proportionnelles au volume de solution déposé sur le papier au départ[8].

Cette interférence est particulièrement intéressante lorsqu'il y a comme pour le zinc, proportionnalité entre le volume de prise et les dimensions des taches, indépendemment de la quantité d'élément contenu dans la prise. Cette propriété permet de *choisir au départ un volume de solution* qui conduise à une tache chromatographiée de zinc se plaçant favorablement dans le chromatogramme en formant une tache isolée. Nous donnons les tableaux et les chiffres relatifs à ces facteurs étudiés à l'occasion de la chromatographie du cobalt, du cuivre et du zinc (Tableau II).

Tableau II. Dimensions des taches d'éléments en relation avec le volume initial de solution

Concentration de l'élément μg	Volume de solution ml	Longueur de la tache (mm)			
		Cobalt α-nitroso β-naphtol	Cuivre acide rubéanique	Zinc dithizone	Zinc oxine
1	0,01	46	23	46/47	35/36
2	0,01	46	—	40/45	24/27
3	0,01	46	25	34/33	15/15
10	0,01	—	29	—	—
3	0,01	46	25	34/33	—
3	0,005	36	18	37/38	—
3	0,003	26	13	48/49	—

Pour les éléments chromatographiquement sensibles à l'humidité, *le conditionnement en eau du papier* a autant d'importance que *l'humidité* du solvant et de la cuve chromatographique.

On n'obtiendra que de mauvaises taches chromatographiques de zinc si on le développe sur du papier sec ou ne contenant que 52% d'humidité. Par contre des taches de zinc bien formées et bien séparées du cuivre s'obtiennent en développant sur papier conditionné à 76% d'humidité, par de la méthyléthyle cétone fraichement distillée et conditionnée au point de vue de son humidité[8].

Pour ces mêmes éléments, plus d'eau dans le papier ou dans le solvant est aussi néfaste qu'une dessiccation complète de la prise, du papier ou du solvant. Ces facteurs jouent donc un rôle important dans l'élaboration d'une technique quantitative.

Pour saisir les conditions précises dans lesquelles une chromatographie doit se faire, de telle sorte que l'on obtienne toujours une petite tache isolée et contenant les 100% de l'élément contenu dans la prise de départ, il faut étudier tous ces *facteurs d'interférence sur chaque élément séparément* et voir ensuite comment en tenir compte dans le développement ultérieur de la solution globale[9].

La nature de la solution de départ est souvent cause de surprises susceptibles d'entraver des séparations difficiles. C'est ainsi que pour

séparer l'aluminium du titane et du fer, il est tout à fait exclu de partir d'une solution de ces éléments dans l'acide chlorhydrique. Le fer et le titane chromatographiés dans ces conditions conduisent à des taches superposées qui chevauchent pour 10% des quantités présentes[7].

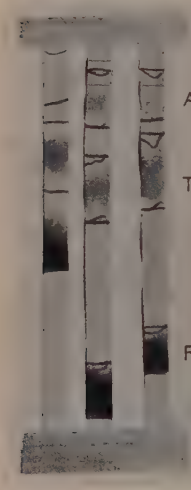


Fig. 1. Chromatogrammes obtenus à partir de solutions différentes de Fe, Ti, Al
(1) Sol. chlorhydrique,
(2) Sol. acétique,
(3) Sol. citrique

Par contre, des solutions acétique ou citrique de ces trois éléments donnent des taches individuelles pour chacun, toutes autres conditions étant maintenues. De plus, chacune de ces taches contient les 100% du fer et du titane déposés. L'obtention de taches individuelles est un avantage du point de vue de la quantitative, parce qu'il laisse pour chaque élément le choix de la technique de dosage la plus sensible, la plus reproductible et la plus rapide.

L'obtention d'une tache individuelle ne signifie nullement à priori qu'elle contient les 100% déposés au départ et ceci doit être contrôlé si le but poursuivi est quantitatif.

On peut voir ci-dessous (Tableau IV) que suivant la *nature des solutions initiales* de chrome. le résultat du dosage de la tache individuelle de cet élément chromatographié peut aussi être fortement influencé par la présence de vanadium ou de molybdène dans la solution. Ces interférences sont éliminées en chromatographiant des solutions simplement chlorhydriques de ces éléments.

Tableau III. Effet de la nature de la solution chromatographiée sur la vitesse de migration (R_f) (chlorures)

Solvants	Durée de développement minutes	10 µg Aluminium		10 µg Titane		10 µg Fer	
		A/C	B/C	A/C	B/C	A/C	B/C
Ac. chlorhydrique 50% *v/v*	(1) 240	0,00	0,25	0,33	0,70	0,67	1,00
		0,00	0,24	0,34	0,68	0,69	1,00
Ac. chlorhydrique 15% *v/v*	(2) 240	0,02	0,20	0,30	0,67	0,77	1,00
Ac. acétique 12% *p/v*		0,02	0,22	0,31	0,67	0,82	1,00
Acétate sod. 16% *p/v*							
Ac. chlorhydrique 15% *v/v*	(3) 240	0,02	0,20	0,26	0,47	0,90	1,00
Ac. citrique 10% *p/v*		0,03	0,22	0,27	0,50	0,85	1,00
Ac. chlorhydrique 15% *v/v*	240	0,00	0,22	0,22	0,52	0,12	1,00
Ac. tartrique 10% *p/v*		0,00	0,22	0,25	0,50	0,12	1,00

Visuellement, dans tous les cas, les taches sont isolées et présentent le même aspect.

Le cas de taches individuelles ne contenant pas les 100% de l'élément mis en dissolution, et engagé dans la chromatographie se présente aussi, lorsque *le solvant de développement n'est pas approprié.* C'est ainsi qu'au départ de solutions dans l'acide chlorhydrique renfermant 1,12 g de KOH les sels de tungstène, de chrome, de vanadium, de molybdène et de fer, donnent une très belle séparation en développant à l'aide de solvants à base d'alcool amylique, de benzène et d'acide chlorhydrique concentré ($S \neq D$ et un contaminant)[11]. Les taches de tungstène ne représentent toutefois que les 86% de la quantité mise en œuvre dans ce cas: une partie étant dispersée dans le papier et perdue pour le dosage[12].

Tableau IV. Influence de la nature de la solution initiale de l'élément sur le résultat de son dosage

Solution initiale de chrome dans HCl 85% v/v + 1,12 g KOH

Dosage du chrome par absorptiométrie (U. D. O.)

1° Elution de 10 μg de chrome déposés sur le papier[10]

U. D. O. chrome seul	U. D. O. chrome + vanadium (1 : 1)	Erreur %	U. D. O. chrome + tungstène (1 : 1)	Erreur %	U. D. O. chrome + molybdène (1 : 1)	Erreur %
M/11 0,214 référence	*M*/4 0,237	+ 11,1	*M*/3 0,210	— 1,86	*M*/3 0,239	+ 11,7

2° Elution de 10 μg de chrome déposés et chromatographiés

M/4 0,217	*M*/4 0,233	+ 7,00	*M*/5 0,213		*M*/8 0,236	+ 8,75
			M/3 0,216		*M*/3 0,233	+ 7,00

Solution initiale de chrome dans HCl 85% v/v

1° Elution de 10 μg de chrome déposés sur le papier

0,220 référence	0,218	— 1			0,218	— 1

2° Elution de 10 μg de chrome déposés et chromatographiés

M/13 0,219	*M*/9 0,219	—			*M*/9 0,218	— 0,4

Si on agite ces mêmes solvants avec de l'eau et opère la chromatographie par partage, la séparation est beaucoup moins belle, en ce sens, que les taches se séparent en deux groupes. La tache de tungstène dans ce cas est cependant dosée quantitativement (Tableau V).

Ces exemples, et il en existe beaucoup d'autres, montrent que lorsque l'on désire obtenir des taches chromatographiées, isolées, quantitatives, il est indispensable de se préoccuper d'un certain nombre de facteurs et d'étudier — en s'aidant d'une technique de dosage adéquate — quelle est leur répercussion sur la composition des taches isolées.

On voit que la technique quantitative est bien différente de celle qui consiste à trouver le solvant adéquat à l'obtention d'une séparation qualitative ou de taches simplement isolées et d'en mesurer les R_f.

Aucune indication n'existe jusqu'ici pour guider dans le *choix du solvant développant*. On sait que les complexes migrent plus vite[13] que les ions non complexés. L'addition au développant d'acide chlorhydrique concentré augmente aussi presque toujours la vitesse de migration.

Tableau V. Influence du mode de développement sur le résultat de dosage absorptiométrique du tungstène

(10 μg — élution — 4,5 cm de papier)
(solution initiale dans HCl 85% v/v + 1,12 g de KOH)

Référence éluée	Expérience de développement avec saturant, développant, contaminant				Expérience de partage	
	Chromatographie du				Chromatographie du	
W seul	W seul		W séparé		W seul	W séparé
M/16 0,131 U. D. O.	M/5 0,121 U. D. O.	Erreur — 9%	M/5 0,116 U. D. O.	Erreur — 14%	M/15 0,133 U. D. O.	M/19 0,133 U. D. O.
	Perte par dispersion dans le papier					

Nous avons déjà vu que la présence d'eau dans le solvant peut entraver ou empêcher toute migration. C'est le cas pour le tungstène, le chrome et le vanadium, soumis à une expérience de chromatographie de partage. D'autres fois nous voyons que l'eau favorise des séparations[8] et des migrations. Le solvant développant est constitué par tâtonnements successifs en s'aidant da la liste de *H. Strain*[3] en procédant souvent à des mélanges aussi bien de composés solubles qu'insolubles dans l'eau, et ce, jusqu'à obtenir le solvant ayant *le meilleur pouvoir séparateur*. De même que dans les expériences de partage il est fait usage d'une phase organique saturée d'eau comme développant et d'une phase aqueuse saturée de solvant organique comme saturant, on peut augmenter le pouvoir séparateur des développants préconisés en utilisant un saturant différent du développant[14].

Contrairement à ce qui était admis, un équilibre entre développant et saturant dans l'atmosphère de l'enceinte chromatographique n'existe pas au moment de la chromatographie inorganique. Les développements sont de si courte durée qu'il est impossible de concevoir qu'après introduction des bandelettes de papier et fermeture de la cuve, il puisse s'y établir, avant le terme de la chromatographie, un réel équilibre des tensions de vapeurs des deux solvants. Cependant, dans le pratique et jusqu'à début de contamination de l'enceinte, il y a reproductibilité

des résultats. *Le vieillissement de l'enceinte* se marque à un rythme régulier et détermine l'évolution progressive des taches chromatographiques, soit *en position*, soit *en dimension* lorsqu'il est fait usage de deux solvants différents, même lorsque ceux-ci sont sans action chimique l'un sur l'autre.

Tableau VI. Contamination progressive du saturant (*S*) par le développant (*D*) (A/C—B/C)

1° Séparation de l'aluminium, uranium, fer[15]

S: benzène; *D*: acétone + 5% HCl *v/v*

	1er	2e	3e	4e	6e	7e jour
Uranium	0,11/16 0,15/22	0,29/36 0,30/35	0,37/45	0,40/45	0,45/61	0,47/64

2° Séparation du tungstène, vanadium, chrome, molybdène, fer[11]

S: alc. amylique (60 ml), benzène (10 ml), ac. chlorhydrique conc. (30 ml)
D: alc. amylique (45 ml), ac. formique (85%) (55 ml)

	1er	2e	3e jour	
Tungstène	0,00/0,07 0,00/0,07	0,00/0,05 0,00/0,06	0,00/0,06 0,00/0,05	
Vanadium-chrome	0,15/44 0,15/44	0,12/40 0,12/46	0,11/40 0,12/45	la tache remonte et diminue
Molybdène	0,55/75 0,57/85	0,55/77 0,55/79	0,54/73 0,53/77	la tache remonte et diminue
Fer	0,78/100 0,79/100	0,80/100 0,80/100	0,85/100 0,85/100	la tache diminue

3° Séparation du cobalt, cuivre, zinc[16,17]

S = *D*: méthyléthylcétone (papier non conditionné)*

	Cobalt	Cuivre	Zinc
1er jour	0,00/0,24	0,42/0,55	0,69/0,90
2e jour	0,00/0,20	0,44/0,53	0,56/0,91

* La contamination du saturant est produite ici par apport de l'eau du papier. Cette séparation est, en effet, fortement conditionnée par l'humidité.

On peut remédier aux inconvénients de ce vieillissement en provoquant un *vieillissement artificiel* de l'enceinte par une *pré-saturation* dont la durée est à déterminer dans chaque cas. Lorsque cette pré-saturation a été efficace, la reproductibilité des positions et des dimensions des taches s'obtient comme si le développant et le saturant étaient identiques, et les mesures de localisation sont aussi spécifiques des éléments. Le plus souvent, c'est la position de la tête de tache qui se régularise.

Tableau VII. Régularité des taches obtenues après une présaturation de 68 heures (10 μg)

Séparation du tungstène, chrome, vanadium, molybdène[11]

S: alc. amylique, benzène, ac. chlorhydrique
D: alc. amylique, ac. formique

Tungstène mm	Espace séparant les taches mm	Chrome + Vanadium mm	Espace séparant les taches mm	Molybdène mm
0—13	4	17—57	41	98—130
0—13	10	23—58	36	94—121
0—11	8	19—50	38	88—123
0—13	4	17—58	40	90—136

Parfois, l'amélioration visuelle et quantitative des taches requiert en plus, *une contamination artificielle* supplémentaire de l'enceinte de saturation[18] pour parfaire le vieillissement artificiel.

Tableau VIII. Regularisation des dimensions des taches chromatographiques par contamination artificielle (A/C—B/C)

1° Séparation de l'aluminium, uranium, fer[15]

S: benzène; *D*: acétone + HCl conc. 5% *v/v* = contaminant

	1er	2è	3è	4è	5è	6è jour
Uranium	0,22/32	0,22/35	0,22/35	0,22/33	0,22/36	0,23/34

2° Séparation du tungstène, vanadium, chrome, molybdène, fer[11]

S: alc. amylique, benzène, ac. chlorhydrique conc.
D: alc. amylique, ac. formique conc.
Contaminant: 17 ml ac. formique conc.

	1er	2è	3è jour
Tungstène	0,00/0,07 0,00/0,05	0,00/0,06 0,00/0,06	0,00/0,06 0,00/0,06
Vanadium-chrome	0,08/0,32 0,08/0,30	0,07/0,26 0,09/0,33	0,07/0,34
Molybdène	0,53/0,65 0,50/0,65	0,45/0,62 0,36/0,61	0,45/0,67
Fer	0,78/100 0,74/100	0,70/100 0,69/100	0,71/100

Cette contamination consiste à placer près du saturant un des éléments du développant agissant sur le chromatogramme par d'infimes quantités.

Il est possible que par tâtonnements successifs on parviendrait à constituer des solvants développant et saturant qui dispenseraient de

Tableau IX. Effet de la contamination artificielle sur les résultats des dosages du tungstène et du chrome

Contaminant 17 ml	Dosages du tungstène 10 µg		Dosages du chrome 10 µg	
	W seul	W séparé	Cr seul	Cr séparé
Dioxane	9,20	9,10		
	9,60	9,60		
Dioxane + ac. formique (1 : 1)	9,56	9,48		
Alc. amylique + ac. formique (45 ml + 55 ml)	9,60	10,20		
Ac. formique (85%)	10,18	10,10	9,85	9,95
	10,00	10,10	10,15	9,98
	10,10	9,90	9,90	10,08
	10,04	9,90	9,95	10,02

l'obligation de présaturer et de contaminer. Cette façon de procéder décrite ici nous a menées au but très facilement. Elle est parfaitement reproductible si l'on utilise des volumes connus et des solvants dont la qualité est standard et contrôlée.

Les précisions données ici ne sont également valables que pour des développements de 8 bandelettes de 1 cm × 25 cm dans des cuves mesurant 25 × 25 × 40 cm.

Ces exemples montrent la nécessité de mener de front l'étude de la séparation qualitative et du dosage des taches.

De nombreux exemples de taches visuellement isolées révèlent une séparation imparfaite par dosage.

Lorsque le dosage se fait en solution après élution, il peut arriver que *le découpage du papier portant la tache* ne soit pas réalisé à la bonne place. Ce découpage a lieu en se référant à des chromatogrammes où les taches sont rendues visibles ou révélés par un réactif. Certains réactifs sont plus sensibles que d'autres, ou diffusent plus dans le papier en agrandissant la tache par rapport à ce qu'elle est réellement. De ce fait le découpage peut empiéter sur l'emplacement d'un autre élément du chromatogramme et entacher d'erreur le dosage ultérieur de cet élément.

Tableau X. Influence du réactif révélateur sur les dimensions des taches de zinc chromatographié (3 µg séparés de Cu et de Co)

Volume de prise ml	Réactif oxine acétique	Révélateur dithizone
	Longueur des taches en mm	
0,010	15/15	34/33
0,005	—	37/38
0,003	—	48/40

L'exemple du zinc chromatographié révélé à l'oxine et à la dithizone est très intéressant à cet égard.

La même tache apparait deux fois plus grande lorsqu'elle est révélée à la dithizone que lorsqu'elle l'est à l'oxine.

Ces deux taches dosées directement sur papier par spectrophotométrie donnent les mêmes résultats. Ceci constitue un argument auquel nous reviendrons plus loin, en faveur de la méthode directe de dosage par spectrophotométrie directe.

Le dosage des taches chromatographiques a été réalisé, soit après élution dans la solution résultante, soit directement sur le papier. La première des deux possibilités est longue et implique à côté de la mise au point chromatographique, celle du procédé d'élution (durée, choix de l'éluant et choix de la technique s'adaptant au dosage de l'ordre de grandeur de l'élément en présence des impuretés du papier et des réactifs employés dans l'élution).

La *colorimétrie*, l'*absorptiométrie* et la *polarographie*, des solutions éluées de 10 μg de tous les éléments dont la chromatographie fut étudiée dans notre laboratoire ont donné une bonne reproductibilité.

Tableau XI. Reproductibilité expérimentale des dosages de taches après elution

Elément chromatographié	Procédé de dosage 10 μg	Reproductibilité %
Aluminium ...	Colorimétrie-Aluminon ..... 5200 Å	$\pm$ 3
Molybdène	Colorimétrie-Tiron ..... 4100 Å	$\pm$ 3,3
Titane	Colorimétrie-Tiron ..... 5600 Å	$\pm$ 4
Fer	Colorimétrie-Diméthylglyox. 4000—4400 Å	$\pm$ 1,4
Nickel	Colorimétrie-Nitroso-R-Sel .. 4500—4900 Å	+ 1,7
Cobalt	Colorimétrie-Diéthyldithiocarbamate 4480 Å	+ 0,6
Cuivre	Colorimétrie-Carmin laque .. 6500—6900 Å	+ 3
Bore	Colorimétrie-Thiocyanate ... 4500—5000 Å	— 0,5
Uranium	Polarographie (50 μg)	— 3

La durée de l'élution (de 1 à 2 ou même 3 heures par tache) constitue un handicap pour faire de la chromatographie quantitative sur papier, une technique microanalytique courante pratique. D'autre part, les techniques de dosage employées doivent se pratiquer sur des solutions résultant du lavage par l'éluant de la tache et addition de réactifs divers. *L'élément à doser dans la tache est donc dilué* de ce fait et les techniques de dosage ont rapidement atteint leur limite de sensibilité. Des quantités inférieures à 50 μg d'uranium deviennent difficiles à doser par polarographie et par absorptiométrie, la reproductibilité baisse lorsque on descend en-dessous de 10 μg. L'addition à l'inconnu d'une quantité bien connue de l'élément à doser, relève le niveau du dosage, mais ne fait qu'augmenter

le taux des erreurs. La manière de constituer *les blancs*, de les évaluer et de les rendre reproductibles nécessite parfois de longs tâtonnements. Il faut y englober toutes les interférences provenant du lavage des matières éluables du papier, des traces de solvants, de réactifs etc. Lorsque ces matières sont susceptibles d'affecter le dosage final, il convient encore de trouver une manière de les rendre inoffensives. La méthode de dosage des taches impliquant une élution, comporte un grand nombre d'aléas et implique de longues recherches pour aboutir à une mise au point et des résultats impeccables. Cette technique sera *toujours limitée* dans ces applications aux très petites quantités.

Pour écourter le travail, on s'est tourné dès le début vers les *techniques directes de dosage des taches chromatographiées*. Celles-ci auraient en outre l'avantage d'éviter les dilutions et d'être utilisables pour des quantités plus petites que 10 μg.

Très vite on s'est servi de *particules marquées ou de matières radioactives* pour rendre la tache chromatographique mesurable directement sur le papier. C'est une technique qui n'est pas utilisable dans n'importe quel laboratoire et tout en étant remarquablement rapide et reproductible autant que sensible, elle n'a pas eu la chance de diffuser en dehors des laboratoires spécialement équipés pour ce genre de travail[6].

La titrimétrie directe sur papier de la tache chromatographiée isolée est pratiquable dans certaines conditions, avec une bonne reproductibilité. Le procédé est recommandable dès que le blanc titrimétrique correspondant au papier peut être réalisé d'une façon reproductible et lorsque le pourcentage d'erreurs dans les manipulations reste inférieur à 5%.

Il a été expérimenté sur des taches de cobalt, de cuivre et de zinc chromatographiés, en titrant à l'aide de complexon III 0,01 *M*.

Tableau XII. Résumé des résultats de titrage complexométrique

Titration directe de	10 μg de cobalt		10 μg de cuivre		7 μg de zinc	
	ml compl.	Erreur %[16]	ml compl.	Erreur %[19]	ml compl.	Erreur %[8]
Solution	0,0170	± 4,0	*M*/20			
	0,0181		0,0407	± 1,1	0,200	± 2,86
Tache chromato-	*M*/4		*M*/5			
graphiée	0,033	± 1,0	0,0446	± 0,8	0,216	± 1,6
Blanc papier	0,016		0,039		0,071	

Le vanadium et le molybdène séparés et chromatographiés ont également été titrés sur le papier par le nitrate de plomb en présence d'indicateur diphénylcarbazide[20].

La limite inférieure pour ce titrage est de 8 μg et sa sensibilité est bonne jusqu'à 11 μg pour le vanadium. Elle est du même ordre pour le molybdène.

La technique de dosage direct qui a occupé le plus grand nombre de chercheurs est la *photométrie* en lumière blanche ou *densitométrie*. La tache à mesurer sur papier, résultant du chromatogramme doit être colorée dans ce but. Si elle ne l'est pas naturellement, il faut procéder par un moyen quelconque à la dispersion d'une couleur sur la surface du papier. Ceci se fait généralement par vaporisations de réactifs. La diffusion de la couleur dans la tache, la forme et la dimension de la tache colorée affectent fortement la mesure. D'autre part, la mesure précise de la tache colorée devrait impliquer la détermination d'un blanc papier,

Tableau XIII. Résultats des titrages du vanadium et du molybdène par le nitrate de plomb

Molybdène				Vanadium			
µg en solution	µg retrouvé		Erreur %	µg en solution	µg retrouvé		Erreur %
11,74	*M*/4	11,32	— 3,5	9,28	*M*/4	9,30	+ 0,3
10,00	*M*/12	9,98	— 0,2	10,10	*M*/10	9,80	— 3,0
12,20	*M*/15	11,97	— 1,8				
11,56	*M*/4	11,64	+ 0,7	11,30	*M*/6	12,00	+ 6,0
11,86	*M*/6	11,80	— 0,5				
11,96	*M*/4	11,96	0				
11,96	*M*/6	11,48	— 3,0				

aussi vaporisé par le réactif révélateur employé. Un *blanc non vaporisé* pourrait à la rigueur se déterminer lorsque la tache colorée chromatographiée à mesurer reste au dépot, en le mesurant préalablement à toute expérience et en déposant ensuite, au même endroit la substance à chromatographier. En aucune façon, *le blanc vaporisé* ne peut se déterminer sur la bandelette sur laquelle se fait l'expérience. Il en résulte une erreur. Il n'est pas plus question de mesurer un blanc vaporisé sur une autre bandelette de papier, à cause des variations d'opacité du papier d'un millimètre à l'autre et d'un endroit à l'autre du papier. L'incertitude du blanc est en photométrie le plus grand handicap, car il *limite l'applicabilité* de cette technique uniquement à la mesure de taches chromatographiques ne migrant pas au-delà du dépôt et ne permet celle-ci qu'aux erreurs dues à la vaporisation du papier près. Les taches colorées par un procédé standard sont passées dans le photomètre et leur opacité est mesurée millimètre après millimètre d'après les réponses qu'une cellule photoélectrique transmet à un galvanomètre.

Les élongations du galvanomètre corrigées pour le blanc non vaporisé, mesuré à l'endroit de la tache sont portées sur un papier millimétré. On obtient en joignant les points, une surface qui est planimétrée. Cette surface est proportionnelle à la concentration de la substance colorée,

de la tache, si les mesures sont faites endéans l'espace de temps pendant lequel la couleur du complexe reste stable. Un diagramme de référence peut être dressé à partir de ces surfaces planimétrées et les mesures d'inconnus sont reproductibles selon le cas à 2 à 5% près[8,16,19]. Cette technique est donc très limitée en application et donne lieu à une accumulation d'erreurs difficiles à surmonter telles que: l'inhomogénéité du papier, l'absence ou l'imprécision des blancs, les erreurs graphiques.

Tableau XIV. Stabilité des complexes sur papier
(surfaces planimétrées et erreurs %)

Photométrie en lumière blanche des complexes												
Cobalt α-nitroso β-naphtol 1 μg				Cuivre acide rubéanique 3 μg				Zinc dithizone 3 μg				
30 minutes		10 jours		30 minutes		10 jours		30 minutes		10 jours		
mm²	%	mm²	%	mm²	%	mm²	%	mm²	%	mm²	%	
555	—	610	+ 0,2	1244	— 0,25	1246	— 0,32	570	+ 0,2	560	— 0,18	
551	— 0,8	600	— 1,0	1245	— 0,15	1248	— 0,16	566	— 0,5	558	— 0,53	
560	+ 1,0	618	— 1,0	1253	+ 0,50	1255	— 0,40	572	+ 0,5	566	+ 0,9	
M/3		*M*/3		*M*/3		*M*/3		*M*/3		*M*/3		
555		609		1247		1250		569		561		

Tableau XV. Photométrie directe sur papier de 0,4 μg de cobalt séparé par chromatographie

Révélé par H_2S et NH_4OH		Révélé par α-nitroso β-naphtol	
Surface planimétrée mm²	Erreur %	Surface planimétrée mm²	Erreur %
132	— 1,5	380	+ 0,5
133	— 0,7	385	+ 1,9
137 [*M*/3 134]	+ 2,2	369 [*M*/3 378]	— 2,3

On peut toutefois obtenir d'elle de grands services car elle permet *sans aucun transvasement* d'atteindre la concentration de substances déposées sur le papier jusqu'à un ordre de grandeur qui selon le cas peut descendre en-dessous du microgramme.

Bien que simple, elle n'est pas rapide à cause des manipulations nécessaires à l'établissement des diagrammes.

Depuis longtemps des efforts sont faits pour mesurer avec plus de précision et directement la *transmission de la lumière* au travers d'une tache colorée formée sur le papier.

Le papier étant très opaque et très peu homogène, ces tentatives ont échoué jusqu'en ces derniers temps. Possédés par le désir de mesurer directement les taches sur le papier par un moyen optique, les chercheurs se tournèrent vers la *reflectance*[21].

E. H. Winslow examine les valeurs respectives de la transmission et de la réflectance dans la mesure des taches de cuivre colorées à la benzoine oxime et celles d'argent fixées par le bromure de potassium et réduites ensuite. Il résulte de cet examen que les mesures de transmission sont cinq fois plus sensibles que celles de réflectance. En transmission, cet auteur parvient à doser jusqu'à 0.31 μg de cuivre et 0,01 μg d'argent.

Les taches expérimentées doivent toutefois être réalisées avec énormément de soins, quant à la reproductibilité des surfaces et la distribution de la couleur sur toute leur étendue. L'auteur n'envisage pas l'application de son procédé à la mesure de taches chromatographiques, mais comme un outil destiné à compléter l'analyse par gouttes.

Un travail plus récent a étudiée la réflectance dans le but de doser des éléments, restant au dépôt après séparation chromatographique des autres éléments de la solution[22].

Un *procédé chromatographique standard* est donc mis au point qui empêche les éléments (nickel) à doser, de migrer et empêche la tache chromatographiée de se déformer en dehors des *limites de surface imposées* par les mesures. *Une vaporisation spéciale* est aussi mise au point qui assure une distribution uniforme de la couleur du complexe (dimethylglyoximate de nickel) sur toute l'étendue de la surface à mesurer — c. à d. — sur un cercle de 27 mm de diamètre. Ce résultat n'est pas atteint facilement. L'appareil est mis à 100% de réflectance sur un blanc et la mesure de taches inconnues à lieu par comparaison avec des taches de référence. Chaque détermination d'inconnue implique l'obligation de tracer un nouveau diagramme de référence et des taches standard pour comparaison. Pour des concentrations de 5 à 20 μg% (solutions pures) en nickel, le coefficient de variation est de l'ordre de 1,5%*. Il faut 4 heures pour réaliser toute l'analyse, mais un grand nombre d'échantillons sont susceptibles d'être examinés en même temps[22].

Cette technique a été modifiée et adaptée à la mesure de la *transmission de la lumière* au travers de taches chromatographiées ayant migré. Les mesures ont lieu à une longueur d'onde bien définie en se servant du spectrophotomètre Beckman DU. Les papiers sont rendus transparents par imprégnation à la paraffine ou au bromonaphtalène et tendus dans un chassis spécial qui défile devant la fente de l'appareil à une vitesse réglable.

* Le coefficient de reproductibilité est faible quand le nickel est l'élément mineur d'une solution.

Les mesures de transmission pour chaque tache sont inscrites sur un diagramme millimètre après millimètre, ce qui donne une courbe en cloche qui doit être planimétrée par la suite[23].

La meilleure reproductibilité de cette technique est de l'ordre de 6% pour des taches de cuivre et de nickel contenant de 0.2—2 μg d'élément. Il est nécessaire de tracer un nouveau diagramme de référence pour chacun des chromatogrammes à mesurer. A part l'emploi du spectrophotomètre, cette technique ne présente aucun avantage sur la simple densitométrie ni du point de vue de la reproductibilité, ni du point de vue de la rapidité. On peut en effet avec un simple densitomètre, mesurer en lumière blanche des taches chromatographiées ayant migré avec une approximation meilleure que celle précisée par *Vaeck*, même si l'on s'abstient de toute détermination de blanc.

Un récent article de *Shukichi Sakuraba* dont nous ne possédons que le résumé anglais nous signale un autre travail ayant trait à la mesure directe de la transmission de la lumière au travers de taches de cobalt et de cuivre complexés par le sulfocyanure et le chlorure de mercure à même le papier.

Ce dernier est rendu transparent par les moyens déjà cités. Les mesures de transmission sont reproductibles à 2.3% près pour le cuivre et à 3.1% pour le cobalt, mais les auteurs se plaignent aussi du manque d'homogénéité du papier[24].

Toutes ces tentatives faites pour mesurer directement les taches sur le papier sont donc entravées par sa grande opacité et son inhomogénéité. Cette dernière difficulté peut toutefois être surmontée, si au lieu de procéder aux mesures millimètre par millimètre, on soumet à l'examen une surface suffisamment grande du papier pour que l'impression *globale* reçue par la cellule photoélectrique représente une intégration de toutes les impressions unitaires d'opacité de cette surface.

On constate ainsi que d'un endroit à l'autre d'une bande de papier et d'une bandelette à l'autre la valeur moyenne de la transmission de la lumière au travers du papier est très reproductible. L'opacité d'autre part, diminue sensiblement en trempant le papier dans l'eau. Ceci a permis de réaliser un grand progrès dans la technique de mesure directe des taches chromatographiées.

Il est en effet facile de glisser une bandelette de papier chromatographique entre la paroi de la cuvette du Beckman et un piston de verre calibré de 9 mm. Un volume de 0.7 ml d'eau bidistillée amène le niveau liquide transmettant la lumière à 0.5 cm du bord et les bulles d'air s'éliminent sans difficulté[25]. Dans ces conditions le transmission du papier blanc trempé dans l'eau est de l'ordre de 0.125 unités de densité optique

avec une reproductibilité de l'ordre de 0.8% s'il s'agit de bandelettes de papier découpées dans du ruban de papier filtre Whatman N° 1.

Lorsque le papier est vaporisé d'une manière standard par un réactif, comme par exemple l'α-nitroso β-naphtol, la densité optique mesurée de diverses bandelettes trempées dans l'eau est en moyenne de 0,129 U. D. O. avec une reproductibilité de l'ordre de 1,2%.

Ceci signifie, que quelque soit la bandelette et quelque soit l'endroit choisi du papier, la mesure de la transmission de la lumière au travers de celui-ci sur une surface équivalente à celle de la fenêtre de la cuvette du Beckman est très reproductible.

Il est probable dès lors, que l'inhomogénéité de coloration de la tache, sa forme, ses dimensions — pour autant qu'elles s'intègrent dans la fenêtre du spectrophotomètre — auront peu ou pas de répercussion sur leurs mesures de transmission.

En effet, en mettant le Beckman au point au zéro de densité optique sur des *blancs vaporisés* standard, on a pu mesurer la transmission des taches de cobalt de cuivre et de zinc révélées respectivement par l'α-nitroso β-naphtol, l'acide rubéanique et la dithizone et l'oxine correspondant à des quantités limites de l'ordre de 0,1 μg de ces éléments.

La possibilité de mesurer des blancs vaporisés reproductibles sur des bandelettes de papier différentes de celles sur lesquelles se forment les taches, permet d'appliquer la technique à toutes les taches chromatographiées, même à celles ayant migré.

Pour les trois éléments étudiés, l'*amélioration* des résultats de la spectrophotométrie et leur reproductibilité sont manifestes lorsque la solution saline a été *chromatographiée.*

Tabelle XVI. Spectrophotométrie directe de taches colorées sur papier (absorption de lumière)

1° Complexe cobalt-α-nitroso β-naphtol

$\lambda = 850$ mμ, $F = 0{,}040$ mm

3 μg U. D. O.	Erreur %	2 μg U. D. O.	Erreur %	1 μg U. D. O.	Erreur %	0,1 μg U. D. O.	Erreur %
M/18 0,0500	1,3	*M*/18 0,0358	2,0	*M*/18 0,0209	3,4	*M*/18 0,0091	14,0

2° Complexe cuivre-acide rubéanique

$\lambda = 660$ mμ, $F = 0{,}095$ mm

M/18 0,2385	0,5	*M*/18 0,164	0,4	*M*/18 0,0904	0,8	*M*/18 0,0243	4,5

3° Complexe zinc-dithizone

$\lambda = 520$ mμ, $F = 0{,}28$ mm

M/18 0,1850	0,13	*M*/18 0,1351	0,16	*M*/18 0,0855	0,58	*M*/18 0,0411	0,68

Dans les limites où nous avons experimenté, les diagrammes de référence sont rectilignes. Les unités de densité optique lues pour des taches correspondant à 0,1 μg d'élément complexé permettent d'entrevoir que ces mesures spectrophotométriques puissent s'appliquer à des quantités encore plus faibles. La limite atteinte actuellement est de 0,03 μg pour le cobalt et 0,02 μg pour le cuivre et le zinc complexés. Ces chiffres, pas plus que les premiers ne sont définitifs, car il est bien certain qu'en changeant de complexant on abaissera encore ces limites, tout en maintenant une reproductibilité élevée.

Tabelle XVII. Spectrophotométrie directe de taches colorées sur papier, après chromatographie de la solution de départ (absorption de la lumière)

1° Complexe cobalt-α-nitroso β-naphtol

$\lambda = 850$ mμ, $F = 0{,}040$ mm

3 μg U. D. O.	Erreur %	2 μg U. D. O.	Erreur %	1 μg U. D. O.	Erreur %	0,1 μg U. D. O.	Erreur %
$M/18$ 0,0640	0,47	$M/18$ 0,0510	0,39	$M/18$ 0,0377	2,1	$M/18$ 0,0267	0,9

2° Complexe cuivre-acide rubéanique

$\lambda = 660$ mμ, $F = 0{,}095$ mm

$M/18$ 0,2453	0,09	$M/18$ 0,1724	0,15	$M/18$ 0,0978	0,22	$M/18$ 0,0296	1,08

3° Complexe zinc-dithizone

$\lambda = 520$ mμ, $F = 0{,}28$ mm

$M/18$ 0,2004	0,09	$M/18$ 0,1532	0,11	$M/18$ 0,1055	0,18	$M/18$ 0,0606	0,29

Les lectures se font au spectrophotomètre en quelques secondes, la préparation de ces mesures dure quelques minutes et permet de traiter plusieurs séries de bandelettes à mesurer simultanément. Un blanc vaporisé par le complexant suffit pour mesurer plusieurs bandelettes et c'est sur celui-ci que se met au point l'instrument au zéro de densité optique. La chromatographie s'effectue en 45 minutes telle que nous l'avons mise au point. Ceci permet de doser les constituants de plusieurs séries de mélanges au maximum en deux heures. *Un seul chromatogramme* suffit par type de solution à analyser et un *seul diagramme de référence* dressé une fois pour toutes, pour chacun des éléments du mélange est nécessaire. Il n'est pas nécessaire de travailler avec un format donné de tache, pourvu qu'elle puisse s'encadrer dans la fenêtre de la cuvette spectrophotométrique.

A cet égard, nous avons signalé plus haut la relation qui lie le volume de la prise aux dimensions des taches chromatographiées, de telle manière

que l'on puisse, grâce à un diagramme particulier à l'élément considéré, *fixer d'avance le volume de solution à prendre au départ pour qu'il en résulte après chromatographie une tache dont les dimensions n'excèdent pas celles de la fenêtre de la cuvette de mesure du spectrophotomètre.* Cette relation permet de se libérer des tâtonnements chromatographiques en vue de rechercher les conditions expérimentales conduisant à des dimensions de taches mesurables. Pour les trois éléments envisagés, la technique a été mise au point quant à la standardisation des blancs, au mode de vaporisation du complexant, à la durée d'attente après vaporisation, quant à la longueur d'onde la plus favorable aux mesures.

Il a en effet fallu tenir compte d'un minime coefficient de dispersion dans l'eau de la cuvette du réactif complexant et du complexe. La longueur d'onde de travail est celle correspondant à l'endroit où les deux courbes d'absorption du complexe (sur papier et en solution) sont les plus éloignées l'une de l'autre.

Outre les nombreux avantages déjà à l'actif de cette technique, il convient d'attirer l'attention qu'elle permet une économie de chromatogrammes par rapport à la méthode quantitative utilisant l'élution. Dans celle-ci, il est toujours nécessaire de sacrifier au moins une bandelette servant de pilote par série de la même cuve, pour déterminer la position exacte des taches du chromatogramme et régler leur découpage. Dans le domaine des ultra micro quantités, il est des cas où, cette pratique peut devenir d'application difficile. Ici *tous les chromatogrammes sont révélés en même temps et tous sont utilisables pour le dosage.* On évite aussi les accidents dûs à un découpage défectueux. Cette nouvelle technique de dosage spectrophotométrique directe des taches sur papier apporte à la chromatographie quantitative sur papier une simplification considérable et en accélère l'exécution. D'autres simplifications sont à l'étude ayant une incidence aussi sur sa rapidité, sa reproductibilité, sa sensibilité ainsi que sur sa généralisation d'emploi en tant que méthode applicable au dosage de quantités inférieures au microgramme.

Résumé

Les progrès réalisés dans la chromatographie quantitative sur papier l'ont été par étapes, en vue d'en faire une technique micro et ultra microchimique ayant une réelle valeur pratique; c'est à dire réalisable en un temps très court, applicable aux quantités de matière les plus petites avec le maximum de reproductibilité. La *spectrophotométrie* directe sur papier des taches colorées utilisant le *transmission* de la lumière au travers de celles-ci répond à ces critères. Elle permet de mesurer en quelques minutes la concentration d'un élément contenu dans une taches avec une reproductibilité supérieure à tout ce qui a été obtenu antérieurement et ce jusqu'à des quantités de l'ordre de 0,02 à 0,03 μg.

D'autres publications feront part de nouvelles améliorations et simplifications, étudiées à l'occasion du cobalt, du cuivre, du zinc, du cadmium, du barium et du plomb.

Zusammenfassung

Die fortschreitende Entwicklung der quantitativen Papierchromatographie führte zur Ausarbeitung mikrochemischer und ultramikrochemischer Verfahren für die Praxis; diese beanspruchen wenig Zeit, sind auf sehr kleine Mengen anwendbar und ausgezeichnet reproduzierbar. Die unmittelbare Spektrophotometrie der Chromatogrammflecken auf dem Papier durch Messung ihrer Lichtdurchlässigkeit entspricht diesen Anforderungen und ermöglicht die Bestimmung der Konzentration eines Elementes im Chromatogramm besser als alle bisherigen Verfahren bis zu einer Größenordnung von 0,02 bis 0,03 μg. Weitere Mitteilungen über Verbesserungen und Vereinfachungen für die Bestimmung von Kobalt, Kupfer, Zink, Cadmium, Barium und Blei sind in Vorbereitung.

Summary

The progress made in quantitative chromatography on paper has been in stages with the objective of making it into a micro- and ultramicro technique of real practical value; that is to say, to render it accomplishable in a very short time, applicable to very slight amounts of material, and with the maximum of reproducibility. Direct spectrophotometry on the paper of the colored stains, utilizing the transmission of the light through the latter, meets these criteria. This procedure makes it possible to determine the concentration of an element contained in a stain within several minutes and with a reproducibility surpassing anything obtained previously, and even with amounts of the order of 0,02 to 0,03 μg. Later papers will deal with the improvements and simplifications studied with respect to cobalt, copper, zinc, cadmium, barium, and lead.

Bibliographie

[1] *L. Genevois*, Rev. gén. pures appl. **62**, 351 (1955).
[2] *A. J. P. Martin* et *R. I. M. Synge*, Biochem. J. **35**, 1358 (1941).
[3] *L. Zechmeister*, Progress in Chromatography. London. 1950; *H. Strain*, Chromatographic Adsorption Analysis. New York: Interscience. 1942; *T. Williams*, An Introduction to Chromatography. Glasgow: Blackie and Son. 1947; *E. Lederer*, Progrès récents de la chromatographie. Paris: Herman. 1950.
[4] *A. Lacourt*, Les silicates industriels **20**, 61 (1955).
[5] Disc. Faraday Soc. **7**, 183 (1949).
[6] *F. H. Pollard* et *J. F. W. McOmie*, Chromatographic Methods of Inorganic Analysis. London: Butterworths Scientific Publications. 1953.
[7] *A. Lacourt*, *G. Sommereyns* et *G. Wantier*, Analyst **77**, 943 (1952).
[8] *A. Lacourt* et *P. Heyndryckx*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 1685.
[9] *A. Lacourt*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 700.
[10] *A. Lacourt* et *G. Sommereyns*, Mikrochim. Acta [Wien] **1954**, 550.
[11] *A. Lacourt*, Ind. chim. Belge **20**, 267 (1955).
[12] *A. Lacourt* et *G. Sommereyns*, Mikrochim. Acta [Wien] **1954**, 604.
[13] *F. H. Pollard*, Endeavour **10**, 213 (1951).

[14] *A. Lacourt G. Sommereyns, J. Hoffmann, A. Stadler* et *G. Wantier*, C. r. acad. sci., Paris **234**, 2365 (1952).
[15] *A. Lacourt, G. Sommereyns* et *J. Soete*, Mikrochem. **38**, 348 (1951).
[16] *H. Flaschka* et *F. Sadek*, Mikrochim. Acta [Wien] **1957**, 1; *A. Lacourt* et *P. Heyndryckx*, Mikrochim. Acta [Wien] **1955**, 61.
[17] *A. Lacourt*, Mikrochim. Acta [Wien] **1955**, 824.
[18] *A. Lacourt, G. Sommereyns* et *G. Wantier*, Mikrochim. Acta [Wien] **1954**, 240.
[19] *A. Lacourt* et *P. Heyndryckx*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 1621.
[20] *A. Lacourt, G. Sommereyns, J. Hoffmann, S. Frank-Fréderic* et *G. Wantier*, Ind. chim. Belge **18**, 1046 (1953).
[21] *E. H. Winslow* et *H. A. Liebhafsky*, Analyt. Chemistry **21**, 1338 (1949).
[22] *S. Vaeck*, Analyt. Chim. Acta **10**, 48 (1954).
[23] *S. Vaeck*, Analyt. Chim. Acta **12**, 443 (1955).
[24] *S. Sakuraba*, Japan Analyst **4**, 496 (1955).

Institute of Medical Chemistry, University of Uppsala, Uppsala, Sweden

Microdetermination of Halogens. A Zinc Absorption Method*

By

W. J. Kirsten

With 1 Figure

(Received December 3, 1956)

For a special purpose it was necessary to determine iodine in a nitrogen stream at very low pressure. As no wet absorbent could be used, metallic silver was tried[1–5]. The silver iodide was dissolved in sodium thiosulphate, oxidized with bromine, and the iodate formed was titrated with thiosulphate. The method worked quite well with relatively small amounts of iodine, but when large amounts were obtained it was difficult to dissolve the silver iodide. Cyanide dissolved it readily, but interfered with the titration. Other metals were then tried. Magnesium absorbed iodine quantitatively only at so high a temperature that the metal reacted, also with the nitrogen, and much nitride was obtained. Zinc was found, however, to absorb the iodine very nicely at 250° C, and it did not react with nitrogen.

It appeared interesting to investigate whether zinc could be used also for the absorption of halogens in dry combustion methods. The apparatus shown in Fig. 1 was used. The samples were burned in a quartz capsule *E* in the quartz tube *D*. The halogens were absorbed in the zinc filling of tube *C*. The heating furnace for the zinc had a temperature of 200° C. The zinc was washed with 25% acetic acid and the halide determined by potentiometric titration with silver nitrate.

Good results were immediately obtained with chlorine and bromine. With iodine the results were extremely variable, sometimes good, sometimes very low. Variation of the temperature of the zinc between 300° C and room temperature had hardly any influence at all upon the results. It was then found that the water content of the combustion gases was

* Dedicated to Prof. Dr. *Hans Lieb* on occasion of his 70th birthday.

the deciding factor. Good results were obtained when the oxygen, before entering the combustion tube, was led through a washing bottle containing water. The temperature of the zinc furnace was found to have little influence upon the results. It is now kept at 50° C. A drop of water (30 μl) was placed in the absorption tube near the joint. The results from the analyses of a series of compounds are given in Table I.

Table I

No.	Substance	Weight of Sample mg	Consumed $AgNO_3$ μl	Halogen Found %	Halogen Calcd. %	Deviation %
1	1-Chloro-2.4-dinitro-benzene	4.147	103.5	17.58	17.50	+ 0.08
2	α-Iodobehenic acid .	3.560	76.3	27.20	27.21	— 0.01
3	2-Amino-5-bromo-4-methylpyrimidine .	3.935	209.5	42.55	42.50	+ 0.05
4	1-Chloro-2.4-dinitro-benzene	3.935	273.3	17.59	17.50	+ 0.09
5	α-Iodobehenic acid .	4.565	97.1	27.00	27.21	— 0.21
6	α-Bromobehenic acid	4.066	98.7	19.40	19.05	+ 0.35
7	1-Chloro-2.4-dinitro-benzene	3.892	196.8	17.93	17.50	+ 0.43
8	α-Iodobehenic acid..	5.949	127.7	27.24	27.21	+ 0.03
9	2-Amino-5-bromo-4-methylpyrimidine .	5.296	283.8	42.83	42.50	+ 0.33
10	1-Chloro-2.4-dinitro-benzene	5.401	269.3	17.68	17.50	+ 0.18
11	α-Iodobehenic acid..	3.941	84.6	27.25	27.21	+ 0.04
12	α-Bromobehenic acid	4.917	120.0	19.50	19.05	+ 0.45
13	1-Chloro-2.4-dinitro-benzene	4.639	231.6	17.70	17.50	+ 0.20
14	α-Iodobehenic acid..	5.070	108.8	27.24	27.21	+ 0.03
15	2-Amino-5-bromo-4-methylpyrimidine .	5.471	292.5	42.73	42.50	+ 0.23

Nitrogen and phosphorus do not interfere. Sulphur is also retained as a mixture of the zinc salts of sulphur-oxygen acids. It is probably possible to make use of this for the determination of sulphur. In the halogen determination the interference of sulphur can be avoided by blowing oxygen from the combustion tube for five minutes through the solution of the halogens after the elution. The sulphur acids, which are not volatilized in this treatment, are oxidized to sulphate. When iodide is determined, a small amount of hydrazine sulphate is added to the solution before the treatment in order to prevent oxidation to iodine. Results obtained with this method are given in Table II.

Table II

No.	Substance	Weight of Sample mg	Thiourea Added mg	Consumed $AgNO_3$ μl	Halogen Found %	Halogen Calcd. %	Deviation %
1	α-Iodobehenic acid..	3.395	1.7	72.9	27.25	27.21	+ 0.04
2	α-Iodobehenic acid..	3.106	0.0	66.8	27.30	27.21	+ 0.05
3	α-Iodobehenic acid..	3.096	1	66.8	27.38	27.21	+ 0.17
4	α-Iodobehenic acid..	3.730	1 –2	79.5	27.05	27.21	— 0.16
5	α-Iodobehenic acid..	2.888	1.5	61.4	26.98	27.21	— 0.23
6	α-Bromobehenic acid	3.113	0.9	74.8	19.20	19.05	+ 0.15
7	α-Bromobehenic acid	3.751	0.0	89.5	19.07	19.05	+ 0.02
8	α-Bromobehenic acid	3.400	0.9	81.5	19.16	19.05	+ 0.11
9	α-Bromobehenic acid	3.375	0.5—1	80.5	19.06	19.05	+ 0.01
10	α-Bromobehenic acid	3.565	0.9	85.0	19.06	19.05	+ 0.01
11	1-Chloro-2.4-dinitro-benzene	3.104	1	153.2	17.50	17.50	0.00
12	1-Chloro-2.4-dinitro-benzene	4.085	0.0	201.3	17.47	17.50	— 0.03
13	1-Chloro-2.4-dinitro-benzene	2.812	1	139.9	17.64	17.50	+ 0.14
14	1-Chloro-2.4-dinitro-benzene	3.657	1	178.8	17.34	17.50	— 0.16
15	1-Chloro-2.4-dinitro-benzene	3.978	0.0	197.9	17.64	17.50	+ 0.14

The halogens can be expelled from inorganic compounds by heating with vanadium pentoxide. As already found earlier[6] this method is not very accurate. Results are given in Table III.

Table III

No.	Substance	Weight of Sample mg	Consumed $AgNO_3$ μl	Halogen Found %	Halogen Calcd. %	Deviation %
1	Potassium bromide..	3.166	263.8	66.59	67.15	— 0.56
2	Potassium bromide..	3.354	272.6	64.96	67.15	- 2.19
3	Potassium bromide..	3.636	303.8	66.78	67.15	— 0.37
4	Potassium bromide..	3.509	296.0	67.42	67.15	+ 0.27
5	Potassium bromide..	3.661	305.4	66.67	67.15	— 0.48
6	Potassium bromide..	2.860	238.4	66.62	67.15	— 0.53
7	Potassium chloride..	2.817	376.5	47.39	47.57	— 0.19
8	Potassium chloride..	2.957	393.9	47.24	47.57	— 0.33
9	Potassium bromide..	2.837	228.2	64.29	67.15	— 2.86
10	Potassium iodide ...	3.641	218.8	76.27	76.45	— 0.18
11	Potassium chloride..	3.188	421.9	46.93	47.57	— 0.64
12	Potassium iodide ...	2.656	157.5	75.26	76.45	— 1.19

Apparatus

The apparatus is assembled as shown in Fig. 1. It is available from Nicroma, Klara Västra Kyrkogata 7, Stockholm. Before entering through *T* the oxygen passes through a pressure regulator, flowmeter, preheater and soda lime tube. The manostat *P* is filled with mercury. *Q* is connected to a water pump. A suitable capillary *S* is used. Its size should be such that the flow through it is two to five time that desired for the gas flow

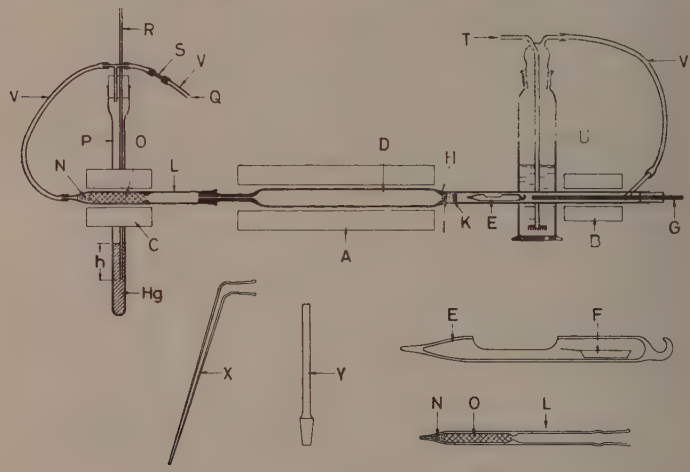


Fig. 1

A = long furnace, length 230 mm, temperature 1000° C, Nicroma type A⁷.
B = movable furnace, split type, temperature 800° C, Nicroma type C⁷.
C = heating furnace for zinc, temperature 50° C.
D = combustion tube, quartz. Inner diameter of sample containing part 9—10 mm, of part in long furnace 12 mm, of capillary 1 mm. Joint: standard tapered joint 7.5/25. Length of tube between sidetube and long furnace 250 mm, length of capillary including joint 60 mm. 20 mm of capillary situated inside the long furnace.
E = quartz capsule for sample. Total length 80 mm.
F = platinum boat.
G = quartz rod for introduction of sample, breaking of capillaries for volatile samples etc.
H = constriction in combustion tube, inner diameter ca. 7 mm.
I = quartz wool.
K = quartz rod, diameter 8—9 mm, length 10 mm.
L = absorption tube. Length of empty part including joint 90 mm, of filled part 70 mm. Inner diameter of tubing 7 mm, of constriction 3 mm, borosilicate glass.
N = pyrex wool.
O = zinc.
P = manostat filled with mercury. Its vacuum is determined by height *h*.
Q = connection to water pump or other vacuum.
R = glass tube connection to atmosphere. *R* is lubricated with silicone grease so that it can easily be moved in the rubber stopper.
S = fine capillary which limits gas flow to vacuum.
T = connection to oxygen supply.
U = sintered glass bottle.
V = rubber connections.
X = gas inlet tube with standard joint. 7.5/25 for expelling sulphur form absorbing solution.
Y = tube with joint 7.5/25 for sucking wash solution into tube *L*.

in the combustion tube. A steady flow of air bubbles will then pass through tube *R* into the manostat, and the pressure obtained in the latter and in connection *V* is determined by the height *h* of the mercury level over the lower orifice of *R*. The tube *R* is lubricated with silicone grease or glycerine so that it can be moved up and down in the rubber stopper in order to adjust the pressure in *P* to a suitable size.

The speed of the movable furnace is adjusted so that the combustion is completed within 7–10 minutes. The furnace *A* is kept at 1000° C, *B* at 800° C and *C* at 50° C. The washing bottle is filled with water.

Titration Method

A commercially available direct reading p_H-meter (Kuntze, Düsseldorf, Germany, Type GKV 2 N) was used. A silver wire scaled into a polyethylene tube was used as the metal electrode, and a calomel electrode with a capillary agar bridge as the reference electrode. The silver wire had a diameter of 2 mm and the part outside the polyethylene was 2 mm long. The titration was carried out with a 0.5 ml Agla syringe burette* with 0.1 normal silver nitrate.

Reagents

Zinc, A. R. Granular, 20 mesh.
Acetic acid, A. R. 25% solution.
Sulphuric acid, A. R. 20% solution.
Alcohol, 99.5%, spectrophotometrically pure.
Ether, U. S. P.
Hydrazine sulphate, A. R., 2.5% solution in water.

Procedure

A drop of water (30 μl) is introduced into the absorbtion tube about 10 mm from the joint. The unlubricated tube is connected to the combustion tube and the sample is introduced. The gas flow is adjusted with the pressure regulator to about 35 ml of oxygen per minute. The manostat is now connected to the absorption tube and the gas flow adjusted to 50 ml/min by adjusting tube *R* suitably.

The furnace *B* is drawn over the tube and the motor is switched on. After complete combustion the manostat is disconnected and the absorption tube is taken out. One ml of 25% acetic acid is pipetted into a small beaker of brown glass. Tube *Y* is connected to the absorption tube and the acetic acid in the beaker is drawn up into and above the zinc filling of the absorption tube and blown out again. This is repeated three times. On the last occasion tube *Y* is disconnected and 2 ml of water

* Burroughs Wellcome & Co. (The Wellcome Foundation Ltd.) London.

are added through the joint of the absorption tube before the level of acid has passed into the zinc. All is blown out into the beaker. When chloride is determined 8 ml of alcohol are pipetted into another beaker, and the alcohol is transferred into the brown beaker by drawing it, portion after portion, up into the absorption tube and blowing it out into the brown beaker. When bromide or iodide are determined 5 ml of water are used instead of the alcohol. One ml of sulphuric acid is added and the solution is titrated with 0.1 normal silver nitrate, the inflection point being taken as the end-point. After the elution the absorption tube is cleaned by drawing through 5 ml of acetic acid, 5 ml of alcohol and 5 ml of ether with the water pump and sucking until dry.

In the analysis of sulphur-containing compounds the absorption tube is eluted as described above. Tube *X* is then connected to the combustion tube and oxygen is blown through the solution during five minutes. When iodine is determined 0.5 ml hydrazine sulphate solution is added before this aeration. The solution is then titrated as usual.

In the analysis of ash-containing compounds the sample is weighed out into a large boat and is covered, or still better mixed, with vanadium pentoxide. The temperature of the movable furnace is raised to 1000 to 1100° C, and the analysis is carried out in the ordinary manner. The use of a quartz capsule is advisable in order to prevent contamination of the combustion tube.

It should also be possible to use other methods for the measurement of the zinc halide obtained. Experiments to apply the method to ultramicroanalysis by spectrophotometric determination of the halide[8] are going on, and experiments to determine sulphur by zinc absorption will also be undertaken.

The author is indebted to Professor *Einar Stenhagen* for his interest in the work, to *Inga-Britt Johansson* for carrying out the analyses and to *Endel Sepp* for drawing the figures. The work was made possible by a grant from the University of Uppsala, Faculty of Medicine.

Summary

A method for the determination of halogens by dry combustion, absorption in metallic zinc and potentiometric titration is described. Chlorine, bromine and iodine as well as their hydrogen and oxygen compounds are quantitatively absorbed by granulated zinc at 50° C in a flow of moist oxygen. The zinc halides are eluted with diluted acetic acid and titrated. Sulphur oxides are also at least partially absorbed by the zinc.

Zusammenfassung

Eine Methode für die Bestimmung von Halogenen durch trockene Verbrennung, Absorption durch metallisches Zink und potentiometrische Titration wird beschrieben. In einem feuchten Sauerstoffstrom werden Chlor, Brom und Jod sowohl als ihre Wasserstoff- und Sauerstoffverbindungen von granuliertem Zink bei 50° C quantitativ absorbiert. Die Zinkhalogenide werden mit verd. Essigsäure eluiert und titriert. Schwefeloxyde werden wenigstens teilweise auch von Zink absorbiert.

Résumé

Description d'une méthode de détermination des halogènes par combustion sèche, absorption par le zinc métallique et titrage potentiométrique. Le chlore, le brome, l'iode ainsi que leurs composés hydrogénés ou oxygénés sont absorbés quantitativement par le zinc granulé à 50° C sous courant d'oxygène humide. Les halogénures de zinc sont élués par l'acide acétique dilué puis titrés. Les oxydes du soufre sont également absorbés par le zinc, au moins partiellement.

Literature Cited

[1] *M. Dennstedt*, Ber. dtsch. chem. Ges. **30**, 1590 (1897).
[2] *A. Lacourt* and *C. T. Chang*, Bull. soc. chim. Belg. **50**, 135 (1941).
[3] *A. Lacourt, C. T. Chang* and *R. Vervoort*, Bull. soc. chim. Belg. **50**, 67 (1941).
[4] *A. Lacourt* and *A. M. Timmermans*, Analyt. Chim. Acta **1**, 140 (1947).
[5] *H. W. Safford* and *G. L. Stragand*, Analyt. Chemistry **23**, 520 (1951).
[6] *W. J. Kirsten* and *Izrael Alperowicz*, Mikrochem. **39**, 234 (1952).
[7] *W. J. Kirsten*, Analyt. Chemistry **25**, 805 (1953).
[8] *W. J. Kirsten*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 1617.

Instituto de Investigaciones Microquímicas de la Universidad del Litoral

Sobre nuevas reacciones microquímicas de la piperacina y del licetol y su aplicación microanalítica*

Por

Benjamín Berisso

Con 6 figuras

(Recibido 10 de diciembre de 1956)

Como consecuencia del estudio que estoy realizando con una nueva serie de sustancias, que pueden integrar complejos microcristalinos, actuando como reactivo la piperacina, dentro de la hipótesis planteada y de los primeros resultados obtenidos, quise constatar la presencia de esta diazina mediante reacciones topoquímicas. De las investigaciones previas que debí verificar me condujeron a la comprobación de la existencia de nuevas reacciones microquímicas que sirven para caracterizar y diferenciar especialmente a la piperacina y del licetol.

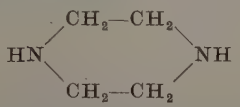
De un medio centenar de textos que he consultado en la búsqueda de datos analíticos de la piperacina, apenas una quinta parte de los mismos consignan referencias de carácter general, que los restantes reproducen. De entre ellos tres aportan reacciones que pueden orientar en su estudio. *Juan A. Sánchez*[1] proporciona algunas reacciones cromáticas y de carácter funcional, citando de paso, que con el reactivo de *Dragendorff*, produce un precipitado microcristalino, de hermoso color rojo escarlata, afirmando que el aspecto del precipitado es semejante al del ioduro mercúrico y que es una reacción característica, por no decir específica. Señala que el cloruro mercúrico, es un reactivo muy sensible el cual precipita abundantemente en color blanco las soluciones al uno por ciento de piperacina. Que este precipitado y color también lo proporciona el reactivo de *Nessler*. *Behrens-Kley*[2] hacen notar como dato de interés la acción del tetracloruro de platino sobre el clorhidrato de piperacina, que en ciertas condiciones de concentración produce microcristales, que se presentan bajo formas de laminitas casi cuadradas de color amarillo claro. A veces al reunirse varios cristales dan lugar a la formación de prismas rectangulares, de doble largo que ancho. *E. Schmidt*[3], afirma

* Al Señor Dr. *Hans Lieb*, Profesor de Universidad, con motivo de su 70º aniversario.

que para caracterizar la piperacina en la orina, puede utilizarse la facultad de precipitar con el ácido pícrico y por ioduro bismútico potásico. Otros autores dan datos similares.

Previa comprobación de las reacciones descriptas por los autores antedichos, que en ningún caso señalan límite de sensibilidad, interferencias, modos de salvarlas, formas cristalinas diferenciables, transformación de los cristales en forma y color, especificidad, comportamiento de los mismos al la luz polarizada, etc., pasé a realizar un análisis detenido de la reacción en estudio.

Analizando la estructura molecular de la piperacina



vemos que se trata de una dietenodiimina secundaria, del grupo de las diazinas, que tiene dos grupos imidídicos en posición para. Es una sustancia sólida, cristalina, transparente y soluble en agua. Funde a 104° C y hierve a 145° C. Absorbe el anhidrido carbónico del agua[1, 2, 3, 4].

Los primeros estudios los orienté en la indagación de si la piperacina en presencia del iodo bismutato de potasio (Reactivo de *Dragendorff*), producía mediante las técnicas conocidas, como dentro de los límites de sensibilidad, prefijados en microquímica, una nueva reacción microcristalina.

Después de varios ensayos infructuosos y de analizar con precisión el mecanismo de la reacción, pude llegar a resultados muy satisfactorios. He comprobado que la piperacina produce una hermosa reacción microcristalina con el reactivo de *Dragendorff*, en medio clorhídrico.

Reactivos

1º Solución de iodo bismutato de potasio. Preparación: Colóquese en un vaso de precipitación 5 gramos de carbonato de bismuto y 40 ml de agua destilada; agítese y añádanse 10 ml de ácido clorhídrico; si es necesario, continúese agregando ácido clorhídrico gota a gota y agitando hasta disolución completa de la sal de bismuto. Por otra parte disuélvanse 40 g de ioduro de potasio en 100 ml de agua destilada y viértase lentamente y agitando, la solución bismútica en la de ioduro de potasio. Fíltrese y consérvese al abrigo de la luz.

2º Solución al medio de ácido clorhídrico p. p. a. densidad 1,19.

Técnica

A una gota de solución al uno por mil de piperacina, puesta sobre un porta-objeto, se le agrega otra de ácido clorhídrico al medio y luego una de iodo bismutato de potasio. Se agita con varilla de vidrio hasta que aparecen a la visual unas estrías de color amarillo oscuro. Se coloca el porta-objeto y se observa al microscopio, notándose una gran cantidad

de cristales de color rojo escarlata, prismáticos, rectangulares, muy bien formados, que cuando se asocian toman formas estrelladas (ver fotomicrografía Nº 1 y 2). En diluciones superiores a 1 : 5000, me ha dado mejor resultado añadir sobre la gota a investigar una pequeña cantidad de ácido clorhídrico puro, cantidad que levanta en su extremo una varilla de 3 mm de diámetro y luego un pequeño exceso del reactivo de *Dragendorff*, agitando con vivacidad a continuación unos tres minutos aparecen las estrías características, índice cierto de la formación de los cristales. Con este mecanismo se produce la reacción hasta en diluciones de uno en quince mil.

Como el licetol, es un tartrato de la α-dimetil piperacina 2 : 5, que según *J. A. Sánchez*, precipita igual que la piperacina con el reactivo de *Dragendorff*, en rojo escarlata, después de comprobar esta reacción, quise ver si desde el punto de vista microcristalino, su comportamiento era similar o presentaba la posibilidad de que ambas sustancias pudieran ser diferenciadas microanalíticamente. Con los mismos reactivos y técnicas propuestas y en un mismo grado de dilución del licetol, procedí a verificar mis primeros ensayos, comprobando una serie de hechos que permiten diferenciar perfectamente bien a ambas sustancias.

Los cristales que proporciona el licetol, con el iodo bismutato de potasio, son totalmente diferentes en forma y color de los que produce la piperacina en iguales condiciones operativas.

En soluciones al uno por mil de licetol, se producen cristales muy característicos, en forma de hoja de malva, agregados cristalinos o de abanico, color amarillo inconfundible. Se presentan también algunos exágonos, bastoncitos de forma prismática, del mismo color, ver fotomicrografía Nº 3 y 4. Esta reacción es mas sensible que la anterior. En diluciones superiores a uno en diez mil, debe seguirse la siguiente técnica. A una gota de la solución de licetol puesta sobre un portaobjeto, se le evapora a sequedad a suave calor mediante una lámpara de alcohol. Se deja enfriar, se agrega una microgota de ácido clorhídrico al medio, o bien, la cantidad de ácido clorhídrico puro, que levanta una varilla de vidrio de 3 mm de diámetro, se remueve el todo, agregándose por último una gota del reactivo de *Dragendorff*. A continuación se agita vivamente con varilla de vidrio hasta aparecer las estrías de color amarillo ya descriptas, se coloca el cubre-objeto y se observa al microscopio, apareciendo los cristales mencionados, que disminuyen en número y grandor a medida que aumenta la dilución. En grandes diluciones predominan los cristales en forma de bastoncitos cortos, solos o en forma de cruces, prismáticos. Con esta técnica la reacción se produce hasta 1 : 50000. Cuando se emplea el ácido clorhídrico puro como reactivo, a veces reacciona con el potasio del iodo bismutato de potasio, produciendo cristales de forma cuadrática, perfectos, muy bien definidos, blancos,

pero que son muy fácil de diferenciar, por su forma y color, y que no interfieren en modo alguno el resultado de la reacción.

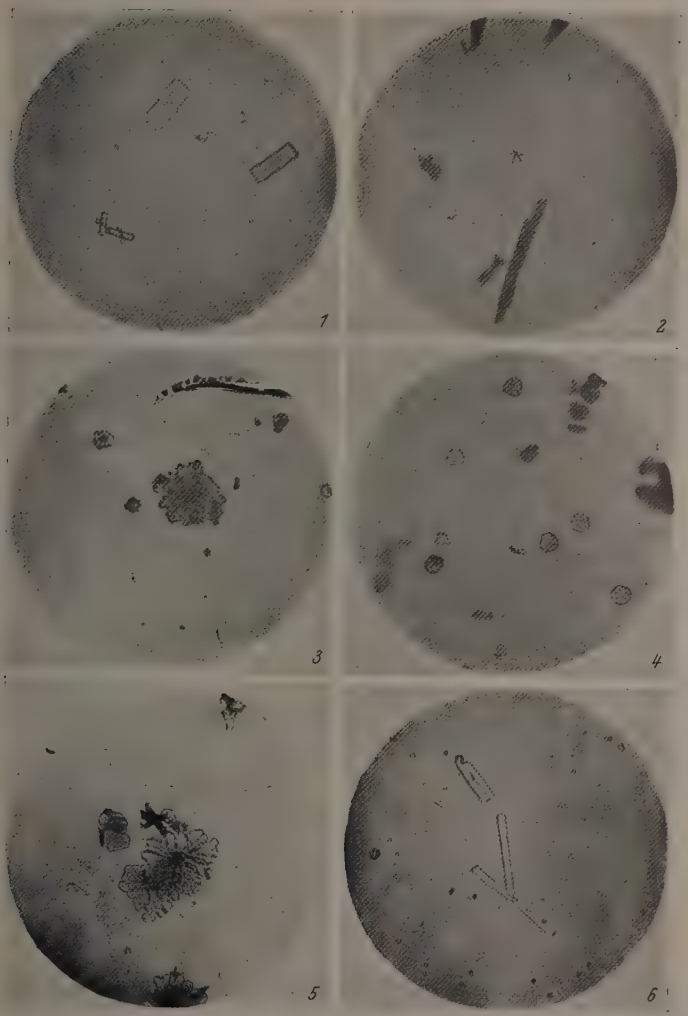


Fig. 1—6

Con estos resultados quise indagar también si podían interferir la presencia del ácido tartárico o un tartrato, dada la constitución molecular

del licetol. A este efecto procedí a realizar una serie de experiencias con las distintas técnicas microanalíticas, obteniendo resultados negativos, con las sustancias mencionadas. Como de estas experiencias se deduce que el ión tartrato no reacciona en presencia de los reactivos, supongo que bajo su acción quedan liberados y por tanto el complejo integrado sería: un iodo bismutato de dimetil piperacina. Como por acción del tiempo aproximadamente dos horas, aparecen algunos cristales en los bordes de la preparación, rojos escarlata, similares en forma y color a los de la piperacina, interpreto que posiblemente los reactivos liberan algunos iones metílicos, quedando igual número de iones libres de piperacina, los cuales en presencia del medio adecuado integran el primer complejo analizado, o sea el iodo bismutato de piperacina. Esta manera de interpretar las reacciones secundarias que tienen lugar, están abonadas por los siguientes hechos: 1º Los cristales secundarios integrados son por su forma y color iguales a los que proporciona la piperacina; 2º Aparecen después de un par de horas en los bordes de la preparación; 3º Son escasos y por el tiempe que tardan en aparecer como por su forma y cromatismo, no interfiere en absoluto la reacción del licetol.

Estudio microanalitico diferencial de la piperacina y del licetol

El reactivo de *Dragendorff*, es excelente para caracterizar y diferenciar rápidamente a la piperacina del licetol, por sus formas cristalinas típicas en cada caso, sensibilidad mucho mayor para el licetol, que no ofrece en iguales condiciones la piperacina.

Quise también comprobar para el caso probable de que las sustancias estudiadas se encontraran en mezclas, si existía probabilidad de diferenciarlas y si presentaban interferencias, cual era el mecanismo para resolverlas. Para esta finalidad procedí a verificar mezclas diferentes de piperacina y del licetol, tal cual lo expreso en los porcentajes que a continuación se detalla.

Mezclas	piperacina	licetol
,,	1%/0	1%/0
,,	1%/0	1%/00
,,	1%/0	1%/000
,,	1%/00	1%/00
,,	1%/00	1%/000
,,	1%/000	1%/00

Con la misma técnica descripta con antelación colocando la gota mezcla sobre el porta-objeto, luego otra de ácido clorhídrico al medio y por último otra gota del reactivo de *Dragendorff*, frotando luego con varilla de vidrio, se notan estrías características de color amarillo oscuro, que observadas al microscopio después de haber puesto el cubre-objeto, se constata la presencia de las dos clases de cristales, los rectangulares,

prismáticos de color rojo escarlata de la piperacina y los de forma de hoja de malva y de exágonos de color amarillo, pertenecientes al licetol (ver fotomicrografía Nº 5). La reacción se produce perfectamente bien, en particular hasta diluciones mezclas al uno por mil de ambas sustancias, por el gran desarrollo de los cristales, que permiten observar en un mismo campo hasta los tres tipos característicos, los rectangulares, prismáticos, de color rojo y los de forma de hojas de malva y exágonos amarillos del licetol. Cuando la mezcla es de uno por mil de piperacina y uno por diez mil del licetol, como es lógico aparecen numerosos cristales de la primera sustancia y escasos de la segunda. Debe buscarse en los bordes de la preparación, donde se notan preferentemente los exágonos, consevando su color amarillo claro, que constituye un contraste notable por su forma y color con los de la piperacina. Como la sensibilidad de la reacción de la piperacina alcanza tan sólo al uno en quince mil, en mezclas cuyas concentraciones fueran de uno en quince mil para la piperacina y de mayor dilución aún del licetol, la identificación se puede hacer en dos fases, primero se caracteriza la piperacina con la técnica descripta y luego en otra gota separada se evapora a sequedad sobre un portaobjeto. se deja enfriar, continuando luego como se ha indicado, produciéndose la reacción hasta el límite de sensibilidad que es para diluciones de uno en cincuentamil. La piperacina en ninguna concentración reacciona mediante el empleo de la técnica de la evaporación de la gota. A la inversa a medida que aumenta la dilución de la piperacina y disminuye la del licetol, en la mezcla, se invierten los valores numéricos de los cristales. Debe tenerse en cuenta en este caso, que los cristales de la piperacina mantienen su forma, disminuyen de tamaño y se atenúa el cromatismo, pero con todo es de fácil diferenciación por su forma y color con los que proporciona el licetol. Una manera de acentuar la diferencia en los cristales es empleando una microgota de ácido clorhídrico p. p. a., por cuanto se desarrollan mejor y en mayor número los cristales de forma de hoja de malva y de abanico.

Otra manera de diferenciar la piperacina del licetol es recurriendo a una reacción de precipitación que produce la piperacina en presencia del cloruro mercúrico, de color blanco, pero que es negativa ante el licetol. He podido comprobar que esta reacción que cita *J. A. Sánchez*[11] es muy sensible, dando lugar a precipitado y coloración hasta en diluciones de uno en cinco mil de piperacina.

Llevada esta reacción al campo microcristalino, mediante la técnica corriente, da lugar a la formación de diminutos cristales, incoloros, verdaderas puntuaciones, formando aglomeraciones características. Desde el punto de vista microcristalino, no ilustra mayormente, pero es conveniente saber como actúan estas sustancias, ya que por otra parte el licetol en iguales condiciones permanece inactivo.

Interpreto que las reacciones en estudio dan lugar a la formación de nuevos complejos microcristalinos, que serían: el iodo-bismutato de piperacina y el iodo-bismutato de licetol. Para indagar si estas tres sustancias en cada caso integraban los complejos mencionados he recurrido a una serie de reacciones topoquímicas. Es conocido el hecho de que *V. Kohlschütter*, fué el creador de estas reacciones, también denominadas inducidas, que se llevan a cabo en el seno del cristal formado como resultado de una reacción anterior, de tal manera que un ión determinado puede ser desplazado de la red cristalina, mediante el empleo de un reactivo específico, dando lugar a una nueva reacción microcristalino, cuyo proceso analítico puede seguirse a la observación microscópica en su total metamorfosis, sea por cambio de color del cristal, o de su forma, o bien por variación de su forma y cromatismo.

Para llenar esta finalidad en primer término me he ocupado del complejo que supongo integrado como un iodo-bismutato de piperacina. De las varias reacciones conocidas en microanálisis del bismuto, he elegido la de *Behrens-Kley*, por su sencillez, formación de cristales definidos y perfectos, como transformaciones ulteriores que se producen por acción del calor, a suave temperatura. Estos autores caracterizan al bismuto mediante el empleo de un pequeño cristalito de oxalato neutro de potasio, en presencia de una microgota de ácido nítrico, lo suficiente para mantener en solución al bismuto. Con la técnica corriente el bismuto da lugar a la formación de unos cristales de forma rómbica, otros aciculares y algunas placas, incoloros. Lograda la reacción, si se separa el precipitado microcristalino y se calienta suavemente a la llama de una lámpara de alcohol, y luego se observa al microscopio, se comprueba que los cristales pimitivos se han transformado definitivamente, tomando la forma tetraédrica, definidos, incoloros.

Con estos antecedentes procedí a provocar mi reacción mediante la técnica que he descripto en esta comunicación, luego con una varilla de vidrio de tres mm de diámetro he agregado una microgota de ácido nítrico p. p. a., y colocado después de remover el todo en el centro de la preparación un microcristalito de oxalato de potasio p. p. a., observando de inmediato la preparación al microscopio, después de colocar el cubreobjeto, se puede seguir el proceso de metamorfosis de los cristales rectangulares, prismáticos, de color rojo del iodo-bismutato de piperacina, que se disgregan, pierden el color paulatinamente hasta que desaparecen y en su seno dan lugar a la formación de otros, romboédricos, aciculares, incoloros, tal cual preconizan *Behrens-Kley*, en su reacción original. Queda de esta manera puesta de manifiesto la presencia del bismuto. Como una comprobación ulterior he completado la reacción de estos autores con una pequeña variante que me ha dado muy buenos resultados. Obtenidos los cristales de iodo-bismutato de piperacina, aprovechando la

propiedad que poseen de ser insolubles en agua, procedí a lavar a los mismos para eliminar el exceso de reactivos, agregando gota a gota, agua destilada, absorbiendo el exceso con papel de filtro. Este se puede colocar suavemente sobre la preparación y una vez logrado el fin deseado, se agrega una microgota de agua destilada, otra de ácido nítrico, se remueve el todo y luego se coloca el cristalito de oxalato de potasio y se observa al microscopio. Se notan los mismos fenómenos descriptos más arriba, con la ventaja de que no es necesario proceder a separar el precipitado para lograr la transformación ulterior de los cristales obtenidos, pues, calentando suavemente el porta-objeto a la llama de una lámpara de alcohol, dejando enfriar y observando al microscopio después de un cuarto de hora aparecen los tetraedros encontrados por *Behrens-Kley*, signo seguro de la presencia del bismuto.

La presencia del iodo, queda evidenciada en el mismo acto de agregar el ácido nítrico al complejo de iodo-bismutato de piperacina, por cuanto, el iodo se pone en libertad por la presencia de un ácido fuerte, dando lugar a la formación de cristales de forma romboédrica de color pizarra obscuro.

En cuanto a la piperacina queda de hecho demostrada su presencia en el complejo por cuanto sin su presencia no existe posibilidad que se forme la reacción en estudio. Con todo quise aplicar una reacción microanalítica que también estudié a lo largo de esta contribución. La piperacina reacciona con el ácido pícrico produciendo cristales prismáticos, sueltos o agrupados en cruces o en estrellas de color amarillo. También se observan rombos exagonales y una forma arborescente que no produce el licetol. En una preparación del complejo en estudio, después de lavar los cristales como he descripto, procedí a agregar una gota de ácito pícrico en solución al 1%, agité luego con una varilla de vidrio, y observé después de colocar el cubre-objeto en la preparación. Pude entonces comprobar como los cristales primitivos perdían su color paulatinamente, luego su forma, para terminar formándose en el mismo lugar anterior, otros nuevos, en forma de estrellas, o sueltos, prismáticos de color amarillo. Es decir que mediante una reacción topoquímica se pone en evidencia la piperacina. De esta serie de investigaciones microanalíticas, que he podido llevar a cabo con buen éxito, creo que mi suposición se ajusta a la realidad, que estamos en presencia de un nuevo complejo de iodo-bismutato de piperacina (ver fotomicrografía Nº 6).

En forma similar se procede a comprobar la presencia del bismuto y del iodo en el complejo denominado iodo-bismutato de licetol. El ácido pícrico al 1%, produce con el licetol formas cristalinas que le son propias, sirviendo simultáneamente para diferenciarlo de la piperacina.

Conclusiones

De todo cuanto antecede se deduce que el iodo bismutato de potasio en medio clorhídrico, constituye un reactivo excelente, para caracterizar y diferenciar a la piperacina del licetol, por sus formas cristalinas típicas en cada caso, su cromatismo propio y sensibilidades diferentes. Ofrece la ventaja que permite individualizar a ambas sustancias en mezclas. El ácido pícrico en solución al uno por ciento, también es útil para la misma finalidad, por cuanto, proporciona sistemas cristalinos diferenciados de ambos compuestos.

Resumen

El A. estudia un nuevo reactivo, el iodo bismutato de potasio, que mediante su aplicación da lugar a nuevas reacciones microcristalinas, que sirven para caracterizar y diferenciar a la piperacina y del licetol. Del estudio microanalítico realizado y de las técnicas aconsejadas deduce que se puede investigar ambas sustancias en mezclas de cualquier proporción, por poseer cada complejo integrado, formas cristalinas, cromatismo y sensibilidades diferentes. Analiza luego, otras nuevas reacciones microquímicas que sirven también como elementos de juicio en la caracterización de las sustancias estudiadas. Se acompañan fotomicrografías de los cristales obtenidos.

Zusammenfassung

Die Anwendung von Kaliumjodbismutat führte zu neuen mikroanalytischen Kristallfällungsreaktionen, die sich zur Charakterisierung und Unterscheidung von Piperazin und α-Dimethylpiperazin eignen. Aus den durchgeführten Untersuchungen und der vorgeschlagenen Arbeitsweise geht hervor, daß beide Substanzen in beliebigen Mischungsverhältnissen nachweisbar sind, da sich die hergestellten Verbindungen hinsichtlich Kristallform, Farbe und Nachweisempfindlichkeit unterscheiden. Es wurden auch andere mikrochemische Reaktionen geprüft, die sich gleichfalls zur Charakterisierung der beiden Substanzen eignen. Abbildungen der erhaltenen Kristalle werden beigebracht.

Résumé

L'emploi de l'iodobismuthate de potassium a conduit à de nouvelles réactions microanalytiques de précipitation cristalline qui sont appropriées à la caractérisation et à la différenciation de la piperazine et de l'α-diméthylpiperazine. Les recherches effectuées et l'application du mode opératoire recommandé par les auteurs montrent que les deux substances sont identifiables dans leurs mélanges quelles que soient leurs proportions relatives; leurs combinaisons avec le réactif se différencient en effet par leurs formes cristallines et leurs couleurs ainsi que par la sensibilité d'identification. Quelques autres réactions microchimiques ont été également éprouvées avec le même succès pour la caractérisation des deux substances. Les cristaux obtenus sont reproduits sur les figures de la communication.

Summary

The use of potassium iodobismuthate led to new microanalytical precipitation reactions which are suited to the characterization and differentiation of piperazine and α-dimethylpiperazine. The studies and proposed procedure show that both materials can be detected in any mixture no matter what their proportions since the compounds formed differ with respect to crystal form, color, and detection sensitivity. Other microchemical reactions were studied, which likewise are suitable for characterizing these compounds. Photographs of the crystals are included.

Bibliografía

[1] *J. A. Sánchez*, Química Analítica de Medicamentos Orgánicos. 1924. p. 392.

[2] *Behrens-Kley*, Organische mikrochemische Analyse. Leipzig: 1922.

[3] *E. Schmidt*, Química Farmacéutica, t. 2, 5 ed., p. 797.

[4] *I. Guareschi*, Enciclopedia de Chimica **10**, 778 (1926).

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Innsbruck

Beitrag zum Nachweis von E 605 in biologischem Material*

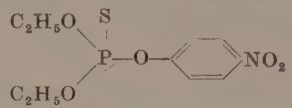
Von

Fr. Scheibl und R. Stöhr

(Eingegangen am 5. Januar 1957)

Mit der Entdeckung der insektiziden Wirkung der Thiophosphorsäureester bzw. ihrer Derivate und deren Verwendung als Pflanzenschutzmittel in der Agrarwirtschaft sind neue, ursprünglich frei im Handel erhältliche chemische Verbindungen der Allgemeinheit zugängig gemacht worden, die wegen ihrer außerordentlichen Giftigkeit zahlreiche Todesfälle verursacht haben.

Von der Vielzahl dieser Insektizide hat das seit dem Jahre 1951 auch in Österreich verwendete E 605 (Parathion)



durch Berufsunfälle, Mord- und Selbstmordversuche eine ähnlich traurige Berühmtheit erlangt wie früher etwa das Arsen oder das Thallium.

E 605 ist eine ölige, braungelbe bis braune Flüssigkeit von knoblauchartigem Geruch, die sich in organischen Lösungsmitteln wie Alkohol oder Äther leicht, in Wasser dagegen nur schwer löst. Der chemische Wirkstoff dieses Pflanzenschutzmittels ist der O,O-Diäthyl-O-p-nitrophenylester der Thiophosphorsäure, der im „E 605 forte" im Verhältnis 1 : 1 mit einem Emulgator gemischt vorliegt. Außer dem E 605 forte wird auch E 605-Staub verwendet; er stellt die Dimethylverbindung dar und kommt mit 98% Talkum in den Handel. Den Wirkstoff von E 605 enthalten auch andere Insektizide, wie Eforol, Ekatox und Wofatox, jedoch ist in ihnen der Gehalt an Wirkstoff wesentlich geringer als bei E 605 forte und dementsprechend ihre Giftigkeit nicht so ausgeprägt. Eine Ausnahme bildet das Eforol ultra mit der gleichen Wirkstoffkonzentration wie das E 605 forte.

E 605 ist ein Kontaktgift, dessen Toxizität bei oraler Verabreichung an Warmblüter dem Nikotin oder Arsentrioxyd entspricht; seine Wirkung beruht auf der Hemmung der Cholinesterase[1].

* Herrn Univ.-Prof. Dr. *Hans Lieb* zum 70. Geburtstag gewidmet.

Da E 605 forte erst seit dem Jahre 1954 giftscheinpflichtig ist, sind zahlreiche Vergiftungen mit diesem Pflanzenschutzmittel bekanntgeworden. Deshalb kommt dem Nachweis von E 605 in biologischem Material — vor allem bei gerichtlichen Untersuchungen — große Bedeutung zu.

Den älteren Arbeiten zufolge beruht der Nachweis von E 605 im wesentlichen auf der Erfassung der p-Nitrophenolkomponente. Diese wird auf Grund ihrer Indikatoreigenschaft[2], ihres Absorptionsmaximums[3] bei 405 mμ, ihrer Titrierbarkeit nach Reduktion[4], ihrer Gelbfärbung im alkalischen Milieu[5] oder ihrer Kupplungsfähigkeit zu Azofarbstoffen[6–12] nach vorangegangener Diazotierung nachgewiesen. Auch auf die Indophenolblau-Bildung[13] und die Reaktion mit Rhodamin[14] zu einem rotfluoreszierenden Farbstoff sei hingewiesen. Besonders erwähnenswert ist aus jüngster Zeit die Identifizierung von E 605 durch Messung der Absorption im UV- und IR-Licht nach vorangegangener Abtrennung durch Wasserdampfdestillation aus schwach saurem Medium[14–16].

Hierzu sei bemerkt, daß ein Rückschluß auf das Vorliegen von E 605 auf Grund eines Farbumschlages bzw. einer Gelbfärbung nicht zulässig ist. Eine Gelbfärbung allein kann auch von anderen, aus organischem Material isolierbaren Verbindungen herrühren und damit eine Vergiftung mit E 605 vortäuschen. Damit wäre die Möglichkeit für ein gerichtliches Fehlurteil gegeben. Dagegen ist der spektralanalytische Nachweis von E 605 sicherlich eine sehr exakte Methode, jedoch wird ihre Anwendbarkeit an manchen Instituten an der fehlenden apparativen Einrichtung scheitern.

Um trotzdem den *chemischen* Nachweis von E 605 bei Vergiftungen mit großer Sicherheit führen zu können, haben wir regelmäßig *neben p-Nitrophenol auch den Schwefelanteil und die Phosphorsäurekomponente* in E 605 nachgewiesen*. Als Untersuchungsmaterial wird in erster Linie der Magen-Darminhalt in Frage kommen. Für den Nachweis von E 605 empfehlen wir nachstehenden Arbeitsgang:

Das Untersuchungsmaterial wird nach Ansäuerung mit Weinsäure einer erschöpfenden Wasserdampfdestillation unterworfen. Das Destillat (zirka 500 bis 1000 ml) fängt man in einer Vorlage mit verd. Natronlauge auf. Dadurch wird der Thiophosphorsäureester gebunden und ein Verlust infolge der leichten Flüchtigkeit von E 605 vermieden. Das natronalkalische Destillat wird am Wasserbad zur Trockene eingedampft, wobei durch Verseifung eine mehr oder weniger starke Gelbfärbung des

* Auch *Reckendorfer*[17] hat in Thiophosphorsäure-Handelspräparaten den Nachweis der Wirksubstanz durch Bestimmung des Schwefel- und Phosphorsäuregehaltes neben dem Gehalt an Methoxy- und Äthoxygruppen geführt. Sein gravimetrisches Verfahren zur Bestimmung von Schwefel und Phosphorsäure ist aber auf biologisches Material nicht übertragbar.

Trockenrückstandes als Hinweis auf die p-Nitrophenolkomponente des E 605 gelten kann. Zeigt ein Teil des Trockenrückstandes nach Lösen in Wasser und Zugabe von Säure einen Farbumschlag von gelb nach farblos und wiederum eine Gelbfärbung nach Alkalisierung der wäßrigen Lösung, so bestärkt dies die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens von p-Nitrophenol.

Zum Nachweis der Schwefelkomponente wird ein Teil des Trockenrückstandes mit metallischem Natrium im Glührörchen aufgeschlossen, der Glührückstand mit Wasser extrahiert, filtriert und das Filtrat mit Natriumnitroprussid versetzt; eine Violettfärbung zeigt die Anwesenheit von Schwefel an.

Zum Nachweis der Phosphorsäure wird ein Teil des Trockenrückstandes mit Königswasser aufgeschlossen (Überführung der Thiophosphorsäure in Orthophosphorsäure). Nach Aufnehmen des Aufschlußrückstandes in Wasser und Abrauchen mit konz. Schwefelsäure versetzt man einen Teil der Lösung mit konz. Salpetersäure und Ammoniummolybdat zwecks Abscheidung der Phosphorsäure als gelbes Ammoniumphosphormolybdat. Diese Reaktion kann negativ ausfallen, wenn die vorhandene Phosphorsäuremenge sehr gering ist und unter der Erfassungsgrenze dieser Methode liegt. In letzterem Falle verwendeten wir das Verfahren von *Müller*[18] zum Nachweis kleinster Phosphorsäuremengen im Blut.

Ein Teil des Aufschlußrückstandes mit Königswasser wird wiederholt mit konz. Schwefelsäure bis zur vollständigen Entfernung der Salpetersäure abgeraucht und mit Natronlauge gegen Lackmus genau neutralisiert. Von der neutralisierten Lösung, die gegebenenfalls wieder konzentriert werden muß, nimmt man 2 ml, versetzt mit 0,4 ml 20%iger Trichloressigsäure, 0,5 ml 2,5%iger Ammoniummolybdatlösung in 15%iger Schwefelsäure und 0,4 ml 0,5%iger Amidollösung, die 5 g Natriumsulfit pro 100 ml enthält. Der Leerversuch wird in analoger Weise angesetzt, wobei man statt 2 ml der neutralisierten Lösung 2 ml dest. Wasser verwendet. Die Reaktion ist nur dann positiv, wenn *innerhalb von 10 Minuten* eine wenn auch nur schwache Blaufärbung auftritt (Reduktion der Phosphormolybdänsäure). Eine später eintretende Blaufärbung darf nicht gewertet werden.

Bei positivem Ausfall der Reaktionen auf sämtliche drei Komponenten p-Nitrophenol, Schwefel und Phosphorsäure kann unseres Erachtens mit großer Sicherheit auf die Anwesenheit von E 605 im Untersuchungsmaterial geschlossen werden. Auch andere, mit Wasserdampf flüchtige Thiophosphorsäureester sind nach diesem Verfahren nachweisbar. Bei dem Insektizid Systox (O,O-Diäthyl-äthylmercapto-äthylthiophosphat) ist wegen Fehlens der p-Nitrophenolkomponente sinngemäß der Nachweis auf das Vorliegen der Schwefel- und Phosphorsäurekomponente zu beschränken.

Zusammenfassung

Es wird die Forderung erhoben, den chemischen Nachweis von E 605 in biologischem Material auf den positiven Ausfall sämtlicher drei Kom-

ponenten von E 605 (p-Nitrophenol, Schwefel und Phosphorsäure) zu gründen, und ein diesbezüglicher Analysengang beschrieben.

Summary

The requirement was raised of basing the chemical detection of E 605 in biological material on the positive outcome of 3 components of E 605 (*p*-nitrophenol, sulfur, phosphoric acid). An analytical scheme of this kind is described.

Résumé

On a montré la possibilité d'identifier chimiquement le E 605 dans les milieux biologiques sur la base d'un essai positif pour ses trois constituants (p-nitrophénol, soufre et acide phosphorique). Description du mode opératoire analytique correspondant.

Literatur

[1] *K. P. Du Bois, J. Doull, P. R. Salerno* und *J. M. Coon*, J. Pharm. Exp. Therap. **95**, 79 (1949); zitiert nach *F. Duspiva*, Angew. Chem. **66**, 541 (1954).

[2] *W. Schwerd* und *G. Schmidt*, Dtsch. med. Wschr. **77**, 372 (1952).

[3] *J. A. A. Ketelaar* und *J. E. Hellingman*, Analyt. Chemistry **23**, 646 (1951).

[4] *K. O'Keeffe* und *P. R. Averell*, Analyt. Chemistry **23**, 1167 (1951).

[5] *E. Romano* und *G. Giulimondi*, Ann. staz. chim. agrar. sperim. Roma (3) Pubbl. Nr. 53, 1—4 (1951); zitiert nach Chem. Zbl. **124**, 6963 (1953).

[6] *P. R. Averell* und *M. V. Norris*, Analyt. Chemistry **20**, 753 (1948).

[7] *J. C. Gage*, Analyst **75**, 189 (1950); zitiert nach Chem. Zbl. **121**, II, 1996 (1950).

[8] *F. A. Gunther* und *R. C. Blinn*, Analyt. Chemistry **22**, 1450 (1950).

[9] *C. W. Wilson, R. Baier, D. Genung* und *J. Mullowney*, Analyt. Chemistry **23**, 1487 (1951).

[10] *H. Zeumer* und *W. Fischer*, Z. analyt. Chem. **135**, 401 (1952); zitiert nach Chem. Zbl. **124**, 1390 (1953).

[11] *H. Kaiser*, Angew. Chem. **65**, 424 (1953).

[12] *P. Dropmann*, Dtsch. Z. gerichtl. Med. **43**, 89 (1954).

[13] *S. v. Eicken*, Angew. Chem. **66**, 551 (1954).

[14] *J. Derkosch* und *F. X. Mayer*, Angew. Chem. **67**, 179 (1955).

[15] *J. Derkosch, H. Jansch, R. Leutner* und *F. X. Mayer*, Mh. Chem. **85**, 684 (1954).

[16] *J. Derkosch* und *F. X. Mayer*, Mikrochim. Acta [Wien] **1955**, 495.

[17] *P. Reckendorfer*, Pflanzenschutzberichte **5**, 287 (1950); zitiert nach Chem. Zbl. **122**, II, 1197 (1951).

[18] *E. Müller*, Z. physiol. Chem. **237**, 35 (1935).

Aus dem Analytischen Laboratorium der Farbwerke Hoechst A. G., Werk Gendorf, Oberbayern

Über einen neuen mikrochemischen Nachweis des Silbers mittels 1-Rhodan-2,4-Dinitrobenzol*

Von

K. Bürger

(Eingegangen am 5. Januar 1957)

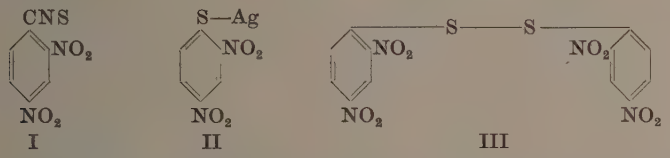
Zum mikrochemischen Nachweis des Silbers wurden vor allem durch *F. Feigl* und seine Schule[1] eine Reihe von Reaktionen, wie z. B. die mit Mangannitrat und Alkali, mit p-Dimethylaminobenzylidenrhodanin oder die katalytische Reduktion von Mn^{3+}- und Ce^{4+}-Salzen erschlossen. Diesen sei der im folgenden beschriebene, überaus empfindliche und spezifische Nachweis mit 1-Rhodan-2,4-Dinitrobenzol, der sich auch zur quantitativen Bestimmung des Silbers aus ammoniakalischen Lösungen eignet, hinzugefügt.

Anläßlich der Aufgabe, in technischen Chargen und in Handelsware des Pflanzenschädlingsbekämpfungsmittels Nirit, dessen wirksame Komponente die Verbindung 1-Rhodan-2,4-Dinitrobenzol (I) darstellt, den wahren Gehalt an dieser Verbindung quantitativ zu bestimmen, wurde folgende chemische Umsetzung ermittelt, die auf elegante Weise die Lösung der eben erwähnten Aufgabe erbrachte.

Versetzt man eine alkoholische Lösung von 1-Rhodan-2,4-Dinitrobenzol bei Siedehitze mit einer wäßrigen ammoniakalischen Silbernitratlösung, so erfolgt eine augenblickliche Fällung eines seidig glänzenden, in feinen langen Nadeln kristallisierten, ziegelroten Körpers, dessen Konstitution durch totale Elementaranalyse und durch Studien des Reaktionsablaufes aufgeklärt werden konnte. Es resultiert die Verbindung II, das Silbersalz des 2,4-Dinitrophenylmerkaptans, unter gleichzeitiger Eliminierung des Cyans aus der Rhodangruppe als Ammoniumcyanid. Diese wird ja schon durch Einwirkung von Ammoniak bei Siede-

* Herrn Univ.-Prof. Dr. *Hans Lieb* zum 70. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

hitze auf eine alkoholische Lösung von Rhodandinitrobenzol erreicht, wobei dann die Verbindung 2,4-2′,4′-Tetranitrodiphenyldisulfid (III) entsteht.



Eine Gegenüberstellung der errechneten Elementprozente mit den gefundenen aus direkten Elementarbestimmungen bestätigen die Bildung des Silbersalzes der oben angegebenen Konstitution.

Theoretische Werte:	*Gefundene Werte:*
C = 23,46%	C = 23,61/23,87%
H = 0,98%	H = 1,06/ 1,19%
O = 20,85%	O = 20,90/20,95%
N = 9,12%	N = 8,93/ 9,24%
S = 10,44%	S = 10,52/10,66%
Ag = 35,14%	Ag = 34,95%

Die schön kristallisierte Substanz ist in den üblichen Lösungsmitteln, wie Alkohol, Aceton, Äther, Benzol, Petroläther usw., unlöslich, leicht löslich hingegen in Pyridin mit leuchtend gelber Farbe. Die Verbindung besitzt keinen Schmelzpunkt und verpufft bei Temperaturen über 300°. Sie ist leicht filtrierbar.

Die Umsetzung von Rhodandinitrobenzol mit ammoniakalischer Silbernitratlösung ist sowohl für die durch die Anwesenheit von zwei Nitrogruppen sehr reaktionsfähig gewordene Rhodangruppe als auch für das Metall Silber spezifisch. Halogendinitrobenzole, alle Nitrobenzole und aromatischen Sulfide und Disulfide geben diese Reaktion nicht. Durch zahlreiche Testanalysen konnte festgestellt werden, daß die Ausfällung des Silbersalzes für eine gegebene Menge Rhodandinitrobenzol quantitativ erfolgt. Darum ist diese Reaktion hervorragend geeignet zur quantitativen Bestimmung des Rhodandinitrobenzols, in gleicher Weise aber auch zu einem empfindlichen Nachweis des Silbers und zu dessen quantitativer Bestimmung aus ammoniakalischer Lösung, denn die Ausfällung des Silbersalzes erfolgt spontan, auch in sehr großen Verdünnungen. Kupfer, Blei, Quecksilber und Zinn zeigen keine Reaktion. In saurem Medium erfolgt keine Niederschlagsbildung. Erwähnenswert ist noch, daß bei Verwendung von Aceton oder einem anderen Keton als Lösungsmittel an Stelle von Alkohol keine Niederschlagsbildung erfolgt, dafür aber eine sich in wenigen Sekunden stark intensivierende veilchenblaue Färbung der ursprünglich gelben Lösung zu beobachten ist. Diese Farbreaktion rührt offenbar aus einer Wechselbeziehung zwischen

der C=O-Funktion des Acetons mit der Aci-Form der Nitrogruppen her, denn andere Ketone, wie Cyklohexanon, Acetessigester oder Acetophenon, geben unter denselben Arbeitsbedingungen denselben Effekt. Verdampft man das Aceton, so erhält man als Rückstand das gleiche Silbersalz wie bei der Umsetzung in alkoholischer Lösung. Verwendet man Ester, Dioxan oder Cyklohexan als Lösungsmittel, so erfolgt in gleicher Weise wie im alkoholischen Medium die Fällung des Silbersalzes.

Der Nachweis von Silber bzw. dessen quantitative Bestimmung wird wie folgt vorgenommen. Eine etwa 5%ige äthylalkoholische Lösung von Rhodandinitrobenzol (wenige Tropfen) werden in einem Spitzröhrchen oder in einem Mikrobecher zum Sieden erhitzt und mittels einer Mikropipette die ammoniakalische Probelösung eingetropft. Es erfolgt sofort Ausbildung einer orangeroten Trübung, die nach kurzer Zeit zur Fällung des Silbersalzes führt. Orangerote, feine, gekreuzte Nädelchen von seidigem Glanz zeigen die Anwesenheit von Silber an. Für den Nachweis von Mikrogrammengen Silber benützt man zweckmäßig einen Objektträger mit Vertiefung und führt die Reaktion auf dem Heiztisch eines Mikroskopes durch.

Zum Nachweis des Silbers in Erzen oder Hüttenaschen wird die Substanz zunächst mit Salpetersäure aufgeschlossen, gegebenenfalls filtriert, ammoniakalisch gemacht und in der beschriebenen Weise zur Reaktion gebracht.

Zusammenfassung

Es wird ein neuer, spezifischer Mikronachweis des Silbers mit 1-Rhodan-2,4-Dinitrobenzol beschrieben, der sich auch zur quantitativen Bestimmung des Silbers aus ammoniakalischen Lösungen eignet. Andere Schwermetalle, wie Kupfer, Quecksilber, Zinn oder Blei, reagieren unter den angegebenen Reaktionsbedingungen nicht.

Summary

A new specific method is described for the micro detection of silver with 1-thiocyanato-2,4-dinitrobenzene. It is suitable for the quantitative determination of silver in ammoniacal solutions. Other heavy metals, such as copper, mercury, tin, lead, do not react under the stated conditions.

Résumé

Description d'une nouvelle méthode spécifique de microidentification de l'argent à l'aide du sulfocyano-1 dinitro-2,4 benzène qui est également approprié à la détermination quantitative de cet élément dans les solutions ammoniacales. Les autres métaux lourds tels que le cuivre, le mercure, l'étain et le plomb ne réagissent pas dans les conditions décrites.

Literatur

[1] *F. Feigl*, Spot Tests, I, Inorganic Applications. Amsterdam: Elsevier. 1954. S. 55ff.

Aus dem Analytischen Laboratorium der Farbwerke Hoechst A. G., Werk Gendorf, Oberbayern

Beitrag zur direkten mikroanalytischen Bestimmung des Sauerstoffes in organischen Verbindungen*

Von

K. Bürger

(Eingegangen am 5. Januar 1957)

Die direkte quantitative Bestimmung des Sauerstoffes in organischen Verbindungen ist infolge der intensiven wissenschaftlichen Bearbeitung ihrer Reaktionsgrundlagen durch *J. Unterzaucher* in verhältnismäßig kurzer Zeit zu einem unentbehrlichen und zentralen Hilfsmittel des Elementaranalytikers geworden. Es ist aber hinreichend bekannt, daß diese Methode bei weitem nicht die Anwendungsbreite besitzt wie andere elementaranalytische Bestimmungsmethoden, ein hemmender Umstand, der seine Ursache in den speziellen Reaktionsmechanismen hat, die dem Verfahren zugrunde liegen. Wir wissen, daß uns die direkte Bestimmung des Sauerstoffes in organischen Verbindungen, die Schwefel, Fluor oder Phosphor enthalten, ferner in metallorganischen Verbindungen und Salzen der Alkali- und Erdalkalimetalle und einer erheblichen Zahl anderer Metalle, bis heute versagt ist. Die Gründe hierfür sind hinreichend bekannt. Der Verfasser ist jedoch der Meinung, daß das im folgenden Beschriebene dazu beiträgt, der Methode der direkten Sauerstoffbestimmung eine, wenn auch wenig breitere Anwendbarkeit zu geben und vor allem ein blindwertfreies Arbeiten der Apparatur zu gewährleisten.

Bekanntlich verläuft die direkte Bestimmung des Sauerstoffes prinzipiell in der Weise, daß die zu analysierende Substanz in einer Atmosphäre reinen Stickstoffs verkrackt wird und die Zersetzungsprodukte über eine zirka 1120 bis 1150° heiße Zone aus Gasruß geführt werden, wo alle sauerstoffhaltigen gasförmigen Produkte quantitativ in Kohlenoxyd übergeführt werden, das nach Oxydation über Anhydro-

* Herrn Univ.-Prof. Dr. *Hans Lieb* zum 70. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

jodsäure zu Kohlendioxyd entweder gravimetrisch oder über die jodometrische Bestimmung des aus der Anhydrojodsäure bei der Oxydation resultierenden Jods maßanalytisch ermittelt wird, woraus dann der Sauerstoffgehalt errechnet wird. Dabei kommt es bei der Analyse schwefelhaltiger Verbindungen zur Bildung von Schwefelkohlenstoff, der dann, über dem Oxydationsmittel oxydiert, zu Fehlresultaten Anlaß gibt; auch fluorhaltige Substanzen ergeben fehlerhafte Resultate. Ferner bietet die Verkrackung in Stickstoffatmosphäre nicht in allen Fällen ausreichende Gewähr, daß die Substanz so weit zerstört wird, daß aller vorhandener Sauerstoff in gasförmige Zersetzungsprodukte übergeführt wird, was notwendig ist, wenn er in Kohlenoxyd übergeführt werden soll. Dies gilt vor allem bei der Analyse metallorganischer Verbindungen.

Angeregt durch die Arbeit *Unterzauchers*[1], die erbrachte, daß Jodpentoxyd der Formel J_2O_5 zur quantitativen Oxydation von Kohlenoxyd zu Kohlendioxyd unter den Bedingungen der direkten Sauerstoffbestimmung infolge seiner Reaktionsfähigkeit mit Wasserstoff ungeeignet ist, und die ferner ergab, daß Anhydrojodsäure der Formel $HJO_3 \cdot J_2O_5$, mit Wasserstoff nicht reagiert, aber die einwandfreie Oxydation des Kohlenoxyds zu Kohlendioxyd vermittelt, wurden Versuche unternommen, den bisher als Trägergas üblichen Stickstoff durch Wasserstoff zu ersetzen, um einerseits die Bildung von Schwefelkohlenstoff aus gewissen schwefelhaltigen Verbindungen zu vermeiden und anderseits die rein thermische Zersetzung der Analysensubstanz durch eine hydrierende Zerstörung zu ersetzen, die eine zuverlässige Gewähr bietet, daß auch bei Organometallverbindungen, soweit sie überhaupt reduzierbar sind, der Sauerstoff als Wasser abgeführt wird. Die unternommenen Versuche zeigten bald, daß unter sonst gleichbleibenden Bedingungen der direkten Sauerstoffbestimmung bei Verwendung von Wasserstoff als Trägergas der Schwefel quantitativ in Schwefelwasserstoff überführbar ist, der interessanterweise vom Gasruß sehr fest adsorptiv gebunden wird. Seine Eluierung aus dem Ruß mit Hilfe des Trägergases erstreckt sich selbst bei Mikromengen über Stunden hin. Bei der Hydrierung fluorhaltiger organischer Verbindungen wird Fluor in analoger Weise in Fluorwasserstoff übergeführt. Diesbezügliche quantitative Feststellungen wurden jedoch bislang noch nicht unternommen.

Nachdem erwiesen war, daß vor allem Schwefel in eine durch Ätzkali quantitativ absorbierbare Verbindung überführbar war und so vor Eintritt der gasförmigen Krackprodukte aus der thermisch hydrierenden Zerstörung in den Oxydationstrakt eliminiert werden konnte, mußte noch geprüft werden, ob die quantitative Überführung von Kohlendioxyd über Kohlenstoff zu Kohlenoxyd bei der gegebenen Reaktionstemperatur von 1120 bis 1150° nach dem Boudouardschen Gleichgewicht auch in Wasserstoffatmosphäre sichergestellt sei, da viele organische Verbindun-

gen, vornehmlich Säuren, bei der thermischen Zerlegung zunächst Kohlendioxyd abspalten. Diesbezügliche Analysen organischer Säuren sowie eine Analyse einer vorgelegten Menge reiner Kohlensäure zeigten, daß die Wasserstoffatmosphäre ohne Einfluß auf die quantitative CO_2-Spaltung ist.

Schließlich mußte noch gezeigt werden, daß Wasserstoff ohne reduzierenden Einfluß auf die Anhydrojodsäure bzw. das als Jodpentoxyd zur Rauchgasanalyse bezeichnete käufliche Produkt, das nach *Unterzaucher*, wenn es nicht thermisch vorbehandelt wurde, ein Gemisch von Anhydrojodsäure und Jodsäure darstellt, bei der Temperatur des siedenden Eisessigs ist, auch wenn er im reichlichen Überschuß vorliegt. Wir verwendeten zu diesem Zwecke ausschließlich das handelsüblich als „Jodpentoxyd zur Rauchgasanalyse" deklarierte Produkt ohne jede Vorbehandlung. Dieses gibt zunächst bei der Temperatur des siedenden Eisessigs (118°) reichliche Mengen Jod ab, die jedoch rasch abnehmen. Nach zirka achtstündigem Überleiten von Wasserstoff hört die Jodabgabe völlig auf und das Produkt — nach *Unterzaucher* Anhydrojodsäure und Jodsäure — ist dann für die Sauerstoffbestimmung einsatzfähig. Mit diesem Befund sind somit die Resultate *Unterzauchers* bestätigt.

Mit diesen Ergebnissen als Grundlage konnte nun das Unterzaucher-sche Verfahren dahingehend modifiziert werden, daß an Stelle von Reinstickstoff als Trägergas reiner Wasserstoff verwendet wird. Dadurch ist es möglich geworden, das allgemeine Sauerstoffbestimmungsverfahren auf die Analyse aller organischen Schwefelverbindungen und auf Organometallverbindungen und Metallsalze und Metalloxyde, die keine Alkali-, Erdalkali- und andere durch Wasserstoff aus ihrer Oxydform nicht reduzierbare Metalle enthalten, zu erweitern. Was die Analysierbarkeit fluorhaltiger organischer Verbindungen betrifft, liegen widersprechende Ergebnisse vor. In einigen Fällen werden stets richtige Resultate erhalten, in anderen wieder nicht. Eine gesonderte Arbeit wird über Fortschritte in dieser Hinsicht berichten. Darüber hinaus bietet diese Verfahrensmodifikation den Vorteil, daß Wasserstoff viel einfacher absolut zu reinigen ist als Stickstoff. Die Reinigung erfolgt katalytisch über Palladiumasbest bei 450°.

Durchführung der Bestimmung

Die zur Bestimmung nötige Apparatur ist genau die gleiche, wie die von *Unterzaucher* in seinen Veröffentlichungen beschriebene. Der Wasserstoff wird einer Stahlflasche mittels eines Reduzierventiles entnommen. Er durchläuft dann den Gasreinigungsofen. Dieser ist ein 15 cm langes Quarzrohr von 1 cm lichter Weite, das elektrisch auf 450° beheizt wird. Als Füllung enthält es Palladiumasbest, den man sich in einfacher Weise dadurch bereitet, daß man Faserasbest oder Quarzwolle in eine zirka

10%ige $PdCl_2$- oder $Pd(NO_3)_2$-Lösung taucht und dann die feuchte Masse in einer nicht leuchtenden Bunsenflamme verglüht. Dieser Kontakt hydriert bei der angegebenen Temperatur mühelos den etwa in Spuren vorhandenen Sauerstoff zu Wasser. Seine Hydrieraktivität nimmt bei höherer Temperatur sehr rasch ab. Es ist deshalb darauf zu achten, daß der Ofen die Temperatur von 450° genau hält. An den Gasreinigungsofen schließt sich der Trocknungstrakt mit Blasenzähler an. Als Trocknungsmittel soll ausschließlich Phosphorpentoxyd auf Bimssteinpulver oder auf Celite verwendet werden. Der Blasenzähler wird mit Silikonöl gefüllt und hat keine andere Funktion als die Kontrolle der Stromgeschwindigkeit des Trägergases. Diese beträgt 2 bis 3 Blasen in der Sekunde. Alle übrigen apparativen Einrichtungen sind von *Unterzaucher* angegeben. Dasselbe gilt für die Arbeitsweise.

Eine neu aufgebaute Apparatur zeigt zunächst begreiflicherweise einen Blindwert. Normalerweise verschwindet er nach 24stündigem Durchleiten von Wasserstoff bei angeheiztem Reaktionsofen. Das käufliche „Jodpentoxyd zur Rauchgasanalyse" behandelt man zweckmäßig gesondert in einem Quarzrohr bei 118° mit Wasserstoff, bis kein Jod mehr abgegeben wird. Man kann sich so das Reagens auf Vorrat herstellen. Es ist vor Licht und Feuchtigkeit geschützt aufzubewahren.

Das kurz beschriebene Verfahren ist seit $1^1/_2$ Jahren als ausschließliche Sauerstoffbestimmungsmethode im analytischen Laboratorium unseres Werkes in Betrieb und hat sich bestens bewährt. Die Fehlerbreite beträgt $\pm$ 0,2%.

Zusammenfassung

Die direkte Bestimmung des Sauerstoffes in organischen Verbindungen nach *Unterzaucher* wurde dahingehend modifiziert, daß an Stelle von Reinstickstoff reiner Wasserstoff als Trägergas verwendet wird. Die quantitative Bildung von Kohlenoxyd aus den sauerstoffhaltigen thermischen Zersetzungsprodukten über Gasruß erfolgt in gleicher Weise wie in Stickstoffatmosphäre. Die jodometrische Bestimmung des Kohlenoxyds wird durch überschüssigen Wasserstoff ebenfalls nicht beeinträchtigt. Diese Modifikation erlaubt die direkte Sauerstoffbestimmung in allen schwefelhaltigen organischen Verbindungen und Organometallverbindungen und Metallsalzen, soweit die Metallkomponente aus ihren Oxyden überhaupt durch Wasserstoff freigesetzt werden kann. Fluorhaltige organische Verbindungen ergaben bisher widersprechende Analysenzahlen. Die Arbeitsweise des Verfahrens bleibt dieselbe wie von *Unterzaucher* angegeben.

Summary

The direct determination of oxygen in organic compounds *(Unterzaucher)* is modified in that the carrier gas is not pure nitrogen but pure hydrogen.

The quantitative formation of carbon monoxide, from the oxygen-bearing thermal decomposition products, over gas black proceeds just as in an atmosphere of nitrogen. The iodometric determination of the carbon monoxide is also not impaired by the excess hydrogen. This modification permits the direct determination of oxygen in all sulfur-bearing organic compounds, also in metallo-organics and metal salts, provided the metal components can be released from their oxides by hydrogen. Organic compounds containing fluorine have thus far yielded contradictory results. The procedure is the same as given by *Unterzaucher*.

Résumé

La méthode d'*Unterzaucher* de dosage direct de l'oxygène dans les combinaisons organiques a été modifiée par l'emploi d'hydrogène au lieu d'azote pur comme gaz de transport. La formation quantitative d'oxyde de carbone par réaction sur le charbon amorphe des produit oxygénés de la décomposition thermique de la prise d'essai a lieu de la même façon qu'en atmosphère d'azote. Le dosage iodométrique de l'oxyde de carbone n'est pas perturbé par la présence d'hydrogène en excès. Cette modification permet le dosage direct de l'oxygène dans toutes les combinaisons organiques soufrées ainsi que dans les combinaisons organométalliques et les sels métalliques dans la mesure ou les oxydes métalliques correspondants sont réductibles par l'hydrogène. Les combinaisons organiques fluorées n'ont fourni jusqu'à présent que des résultats contradictoires. Le mode opératoire de la méthode reste celui qui a été décrit par *Unterzaucher*.

Literatur

[1] *J. Unterzaucher*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 822.

Aus dem AEG-Forschungsinstitut Belecke

Die mikromaßanalytische und polarographische Bestimmung von Thalliumspuren*

Von

F. A. Pohl und **K. Kokes**

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 8. Januar 1957)

Einleitung

Das verbreitete Vorkommen von Thallium in geringen Mengen und dessen mannigfaltige Bedeutung in Biochemie und Technik bedingen das große analytische Interesse für dieses Element. In den vergangenen drei Jahrzehnten ist deshalb eine große Zahl von Vorschlägen für den Nachweis und die Bestimmung von Mikromengen Thallium gemacht worden.

In fast allen Fällen, wie etwa in Mineralien, Legierungen, Flugstauben, Lebensmitteln oder biologischen Substanzen ist die zu bestimmende Thalliummenge mit einem sehr großen Ballast von Begleitelementen vergesellschaftet und die eigentliche Aufgabe der Analyse besteht in der verlustlosen und vollständigen Trennung des Thalliums, nach deren Durchführung die quantitative Bestimmung meist kaum mehr Schwierigkeiten bietet.

Für die Trennung des Thalliums von anderen Elementen findet man zahlreiche mögliche Reaktionen. Von diesen versagen jedoch die meisten, wenn sich das Mengenverhältnis des Thalliums zu den Begleitelementen wesentlich verkleinert. So sind die am meisten gebräuchlichen Fällungen als Jodid, Chromat, Sulfid, Hydroxyd, Thionalat oder mit anderen organischen Reagenzien für die Spurenanalyse nur in wenigen Fällen und dann meist nur unter Verwendung von Spurenfängern anwendbar.

In bestimmten Fällen gelingt die Anreicherung des Thalliums durch Zementation am Zink oder Magnesium[1] oder elektrolytisch mit angelegter Spannung[2], doch scheiden sich in beiden Fällen mit dem Thallium

* Herrn Prof. Dr. *Hans Lieb* zum 70. Geburtstag ergebenst gewidmet.

auch Kupfer, Blei und andere Metalle ab, wodurch die Anwendungsmöglichkeit dieser Verfahren stark eingeschränkt wird.

Besser sind jene Reaktionen geeignet, die zu extrahierbaren Komplexverbindungen führen. Von diesen fand die Extraktion mit Dithizon am meisten Anwendung[3–6]. Nachteilig ist hierbei, daß die Reaktion mit Dithizon für Thallium keineswegs spezifisch ist und nach Untersuchungen von *Haddock*[3] größere Mengen maskierbarer Elemente die vollständige Extraktion des Thalliums verhindern. *Sandell*[7] gibt für die Trennung des Thalliums von allen anderen Metallen eine Kombination der Dithizonextraktion mit der Ätherextraktion aus 6-n Salzsäure an. Die Ätherextraktion aus 6-n Salzsäure wurde bereits von *Noyes*[8], später von *Baldeschweiler*[9] und *Shaw*[10] angewendet und besitzt gegenüber der Dithizonmethode gewisse Vorteile. Vor allem ist hierbei die zeitraubende nasse Veraschung des extrahierten Komplexes nicht erforderlich, die bei Dithizon vorgenommen werden muß, wenn die Endbestimmung nicht kolorimetrisch mit dem Dithizonat selbst durchgeführt werden kann. Allerdings ist eine Trennung vom Eisen mit der Äther-Salzsäure-Extraktion schwierig. Dies ist ein wesentlicher Nachteil, da Eisen sowohl in anorganischen als auch in biologischen Substanzen meist in bemerkenswerten Mengen anwesend ist.

Nach Angaben von *Wada* und *Ishii*[11] ist eine weitgehende Trennung des Thalliums von fast allen Elementen mit einer Ätherextraktion aus Bromwasserstoffsäure möglich, doch ist davon bisher kaum Gebrauch gemacht worden.

Die Ätherextraktion des Thalliums

Im Zusammenhang mit Untersuchungen der Eigenschaften von Selengleichrichtern trat die Notwendigkeit zur Bestimmung von sehr geringen Mengen Thallium in Cadmium, Zinn, Wismut, Selen, sowie in Seleniden, Sulfiden und Legierungen der genannten Metalle auf. Die Bestimmungsmethode sollte sehr empfindlich und für Reihenuntersuchungen einfach und rasch sein.

Ein Überblick über die aus der Literatur ersichtlichen Möglichkeiten zur Trennung und Isolierung des Thalliums ließ den Weg der Ätherextraktion am geeignetsten erscheinen.

Neben den qualitativen Angaben von *Wada* und *Ishii*[11] und den quantitativen Untersuchungen von *Irving* und *Rosotti*[12], *Bock*[13] und *Lounamaa*[14] finden sich noch vereinzelte, zum Teil — wohl auf Grund verschiedener Arbeitstechnik — widersprechende Angaben anderer Autoren in der Literatur.

Wir unterzogen daher die Möglichkeiten der Ätherextraktion des Thalliums aus salzsaurer, bromwasserstoffsaurer und jodwasserstoffsaurer Phase einer eingehenderen Betrachtung.

Zur Untersuchung der Extrahierbarkeit der interessierenden Elemente aus salzsaurer, bromwasserstoffsaurer und jodwasserstoffsaurer Phase bei verschiedenen Säurenormalitäten schüttelten wir in zylindrischen Schütteltrichtern jeweils 20 ml saure Phase, die 100 mg des untersuchten Elementes als das entsprechende Halogenid enthielt, mit 40 ml Äther 3 Minuten lang und entnahmen von oben nach Phasentrennung genau 20 ml Ätherphase zur analytischen Bestimmung der extrahierten Menge des Elementes. Die Extraktionen wurden zunächst mit Äthyläther und Isopropyläther vorgenommen. Es zeigte sich jedoch, daß die Extraktionskoeffizienten der wenig extrahierbaren Elemente, wie z. B. Kupfer, Zink, Cadmium und Wismut, bei Verwendung von Isopropyläther um mehr als eine Zehnerpotenz niedriger sind als mit Äthyläther und daher Trennungen bedeutend schärfer ermöglichen.

Von den wenigen Elementen, die gemeinsam mit Thallium in die Ätherphase treten (Tabelle 1) sind bei einer maßanalytischen Thalliumbestimmung nur von Eisen, Arsen, Antimon und Zinn Störungen zu erwarten, während die übrigen praktisch kaum in der Probe vorhanden sind. Arsen, Antimon und Zinn können leicht durch Verflüchtigung mit wenigen Milliliter Salzsäure-Bromwasserstoffsäure-Gemisch[15] restlos entfernt werden, so daß die Trennung von Eisen als eigentliches Problem verbleibt.

Tabelle 1. Mit Äther aus Halogenwasserstoffsäuren extrahierbare Elemente

Aus 6-n HCl	Aus 4-n HBr	Aus 2-n HJ
Fe^{3+}, Tl^{3+}, Ga, Au^{3+}, Ge^{4+}, $As^{3+,5+}$, $Sb^{3+,5+}$, Te^{4+}, Mo^{6+}, $Sn^{2+,4+}$	In^{3+}, $Tl^{+,3+}$, Fe^{3+}, Ga, Au^{3+}, $Sn^{2+,4+}$, Sb^{5+}, Mo^{6+}	Cd, Hg^{2+}, Sn^{2+}, Sb^{3+}, In^{3+}, Te^{4+}, Mo^{6+}

Betrachtet man die Extrahierbarkeit der genannten Elemente in Abhängigkeit von der Säurenormalität, so wird die Zahl der in Tabelle 1 angeführten Elemente mit abnehmender Acidität immer geringer.

In Abb. 1 sind die Extraktionskurven für Eisen und Thallium mit Isopropyläther dargestellt. Wie aus dem Diagramm zu entnehmen ist, kann Thallium aus 0,5- bis 2-n Jodwasserstoffsäure und 2,5- bis 3,5-n Bromwasserstoffsäure quantitativ extrahiert und dabei vom Eisen abgetrennt werden. Aus salzsaurer Phase könnte die Trennung unter Umständen auch noch durchgeführt werden, doch erscheint Bromwasserstoffsäure am geeignetsten, weshalb wir diese für alle weiteren Versuche verwendeten. Da bei der Extraktion aus Jodwasserstoffsäure Cadmium in die Ätherphase tritt, kam diese Art der Thalliumanreicherung für unsere Zwecke nicht in Betracht. Bei der Anreicherung von Thallium aus den eingangs erwähnten Probesubstanzen erwies sich die Brom-

wasserstoffsäure-Ätherextraktion aus 3-n HBr stets in gleicher Weise als geeignet, so daß auf deren Grundlage Methoden zur Bestimmung von Thalliumspuren in der Größenordnung von 1 bis 1000 μg in den verschiedenartigen Substanzen ausgearbeitet werden konnten.

Die Endbestimmung der isolierten Thalliumspuren ist auf mannigfaltige Art möglich. Wir haben im Interesse einer möglichst raschen Durchführbarkeit eine mikrojodometrische und eine polarographische Methode entwickelt, deren Ausführungen nachstehend am Beispiel des Cadmiums angegeben sind. Bei der jodometrischen Bestimmung gingen wir von der für Erzanalysen von *Kilian*[16] mitgeteilten Methode unter Verwendung der Membranbürette von *Gorbach* aus. Für die polarographische Bestimmung wählten wir in Anlehnung an Angaben von *Ennslin*[17] Ammoniak als Grundlösung. Die Messungen wurden mit dem Kathodenstrahlpolarographen K 1000 von Southern Instruments durchgeführt. Das mit 0,52 V in der Literatur allgemein angegebene Halbstufenpotential des Thalliums lag bei unseren Messungen mit dem genannten Polarographen in 6-n Ammoniak zwischen 0,27 und 0,30 V.

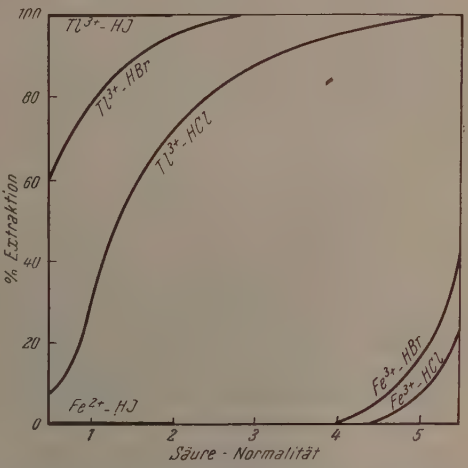


Abb. 1. Die Extrahierbarkeit von Thallium und Eisen mit Isopropyläther aus Halogenwasserstoffsäuren in Abhängigkeit von der Säurenormalität

Die polarographische Bestimmung von Thallium in Cadmium nach extraktiver Anreicherung

Bedarf an Reagenzien

Salpetersäure, p. a. konz., mit bidest. Wasser 1 : 1 verdünnen.
Bromwasserstoffsäure, 3-n; 6-n HBr mit bidest. Wasser verdünnen.
Natriumbromat, p. a. pulv.
Isopropyläther, über $FeSO_4$ und NaOH redestilliert.
Perchlorsäure, p. a. konz.
Schwefelsäure, 6-n.
Hydrazinsulfat, 1%ige Lösung in bidest. Wasser.

Ammoniak, 12-n, aus bidest. Wasser und Ammoniakgas in einer Polyäthylenflasche bereiten (Eiskühlung!).

Ausführung der Thalliumbestimmung

Man wägt 1 g Cadmiumspäne (oder mehr) in ein 100-ml-Becherglas ein und löst in 10 ml HNO_3 (bei höherer Einwaage entsprechend mehr), dampft unter Oberhitze zur Trockne ein. Den Rückstand nimmt man mit 50 ml 3-n HBr auf und erwärmt, bis alles gelöst ist. Man führt nun die klare Lösung in einen Schütteltrichter (250 ml) über und wäscht mit 3-n HBr nach. Zur Oxydation von Tl setzt man eine Spatelspitze $NaBrO_3$ zu. Man extrahiert nun dreimal mit 20 ml Isopropyläther je 3 Minuten lang und saugt nach Phasentrennung die Ätherphase mit einer Kapillare in einen kleineren (100-ml-)Schüttelzylinder ab. Die vereinigten Ätherphasen werden im kleinen Schüttelzylinder dreimal mit je 20 ml 3-n HBr rückgeschüttelt (je 1 Minute). Nach Phasentrennung läßt man die HBr-Phase jeweils ab. Nach der 3. Extraktion läßt man den Ätherextrakt in ein 100-ml-Becherglas ab, wäscht mit 10 ml Isopropyläther nach und verdampft den Äther mit Oberflächenhitze. Zur Zerstörung organischer Substanzen raucht man auf dem Sandbad bei Oberhitze mit je 2 ml $HClO_4$ wiederholt ab, bis der Rückstand ungefärbt erscheint. Hierbei benetzt man mit der Perchlorsäure jedesmal auch die Becherglaswände.

Zum Rückstand fügt man 3 Tropfen 6-n H_2SO_4 und 1 Tropfen $N_2H_4 \cdot H_2SO_4$-Lösung, erwärmt schwach auf dem Sandbad, bis der Rückstand fast trocken ist; man gibt nun 0.5 ml H_2O bidest. zu und verteilt durch Schwenken über den ganzen Boden des Becherglases. Nun setzt man 0,5 ml NH_4OH zu, mischt und füllt hierauf in die polarographischen Zellen, die bereits Anodenquecksilber enthalten, ein. Nach Austreiben von Sauerstoff und Luft mit Wasserstoffgas wird die Lösung polarographiert.

Arbeitsbereich: 0,1% Tl bis 0,0001% Tl/Cd.

Eichkurve: In acht Bechergläsern wägt man je 3 g $CdBr_2 \cdot 4\,H_2O$ ein und setzt folgende Mengen 0,001-m Thalliumacetatlösung zu:

1.	1 ml	204	µg Tl/ml
2.	0,5 ml	102	µg Tl/ml
3.	0,2 ml	40,8	µg Tl/ml
4.	0,1 ml	20,4	µg Tl/ml
5.	50 µl	10,2	µg Tl/ml
6.	20 µl	4,08	µg Tl/ml
7.	10 µl	2,04	µg Tl/ml
8.	5 µl	1,02	µg Tl/ml

Man nimmt in 50 ml 3-n HBr auf, führt in einen 250-ml-Schütteltrichter unter Nachwaschen mit 3-n HBr über und verfährt weiter, wie bei der Analyse angegeben. Die Meßpunkte trägt man auf doppelt logarithmisches Papier auf.

Die jodometrische Mikrotitration von Thallium nach extraktiver Anreicherung

Bedarf an Reagenzien für die jodometrische Titration

Salzsäure, konz.
Bromwasser, gesättigt.
Phenollösung, 2%ig in bidest. Wasser.
Ammoniumfluorid, 10%ig in bidest. Wasser.
Kaliumjodid, 20%ig in bidest. Wasser.
Stärkelösung, 1%ig.
Natriumthiosulfatlösung, 0,01-n, täglich frisch hergestellt durch Verdünnen aus 0,1-n Lösung.

Ausführung der Thalliumbestimmung

Die Einwaage der Probesubstanzen wird so gewählt, daß die zu titrierende Thalliummenge zwischen 40 und 200 μg bei Verwendung von 0,01-n Thiosulfat und zwischen 200 und 2000 μg bei 0,1-n Thiosulfatlösung zu liegen kommt. Die Proben werden zunächst so behandelt, wie es in der Vorschrift zur polarographischen Bestimmung einschließlich der Isopropylätherextraktion angegeben ist.

Der mit Perchlorsäure bis zur Farblosigkeit abgerauchte Rückstand der Ätherextraktion wird mit bidest. Wasser aus einer Mikrospritzflasche in einen Mikrobecher gespült. Hierbei wird so gearbeitet, daß das Volumen der wäßrigen Lösung 1 ml nicht übersteigt. Bei mehr als 200 μg Tl kann das Volumen einige Milliliter umfassen. Man setzt nun 3 Tropfen konz. HCl und 1 Tropfen Bromwasser zu, wobei die Gelbfärbung bestehen bleiben muß. Man nimmt nun den Überschuß an Bromwasser mit einem Tropfen Phenollösung (Entfärbung) weg. Sollte eine Trübung entstehen, ist bis zum Klarwerden zu erwärmen und dann wieder abzukühlen. Hierauf werden 0,5 ml NH_4F-Lösung zur Maskierung eventuell noch vorhandener Eisenspuren, 0,5 ml KJ-Lösung und 3 Tropfen Stärkelösung zugefügt. Mit frischer Thiosulfatlösung wird nun aus einer Gorbach-Membranbürette bis zur Entfärbung titriert, wobei man dauernd mit einem Glasstäbchen rührt.

Der von jedem Titrationswert zu subtrahierende Blindwert wird analog dieser Vorschrift bestimmt, indem man zu 1 ml bidest. Wasser Salzsäure, Bromwasser, Phenollösung usw. gemäß der Vorschrift zusetzt und wie oben angegeben titriert.

1 μl 0,01-n Natriumthiosulfat $\equiv$ 1,022 μg Tl.

Die Thalliumbestimmung in anderen Probesubstanzen

Die Thalliumbestimmung kann nach der angegebenen Methode praktisch in fast allen anfallenden organischen und anorganischen

Materialien durchgeführt werden, wenn die Probe auf geeignete Weise mineralisiert bzw. in Lösung gebracht und ein in 3-n Bromwasserstoffsäure löslicher Trockenrückstand gebildet werden kann. Der Rückstand darf keine organischen Substanzen mehr enthalten. Mit diesem Rückstand verfährt man wie mit dem Trockenrückstand des in Salpetersäure gelösten Cadmiums. Auch größere Mengen Eisen stören nicht. Bei Anwesenheit von Zinn, Arsen oder Antimon ist es zweckmäßig, den Rückstand der Ätherphase nach Vertreiben des Äthers mit 0,5 ml konz. Schwefelsäure zu versetzen und zweimal mit 3 ml HCl-HBr-Gemisch (15 Teile konz. HCl und 10 Teile konz. HBr) auf dem Sandbad mit Oberhitze bis zum Auftreten von Schwefelsäuredämpfen abzurauchen. Hierauf wird wie angegeben mit Perchlorsäure abgeraucht, bis der Rückstand farblos erscheint, und nach der Vorschrift weiter verfahren.

Die Verfasser danken Fräulein *I. Polewacz* und Herrn *W. Bonsels* für die sorgfältige Ausführung der Versuche.

Zusammenfassung

Die Möglichkeiten zur Isolierung von Thalliumspuren werden kritisch betrachtet. Die Ätherextraktion aus salzsaurer, bromwasserstoffsaurer und jodwasserstoffsaurer Phase wird untersucht. Thallium kann in Anwesenheit größerer Mengen von Eisen, Kupfer, Zink und anderen Dithizonmetallen sowie Alkalien und Erdalkalien aus 3-n Bromwasserstoffsäure mit Isopropyläther quantitativ isoliert werden. Die isolierten Thalliumspuren von 1 bis 1000 μg werden mikrojodometrisch oder polarographisch bestimmt. Die polarographische Bestimmung erfolgt in 6-n Ammoniak als Grundlösung. Das angegebene Anreicherungsverfahren ermöglicht die Bestimmung von Thallium in fast allen organischen oder anorganischen Materialien spezifisch und sehr empfindlich.

Summary

A critical review of the possibilities of isolating traces of thallium is given. A study was made of the ether extraction from the hydrochloric, hydrobromic, and hydriodic acid phase. Thallium can be quantitatively isolated by means of isopropyl ether from 3 *N* hydrobromic acid in the presence of considerable amounts of iron, copper, zinc, and other dithizone metals as well as alkalis and alkaline earths. The isolated traces of thallium, from 1 to 1000 μg are determined microiodometrically or polarographically. The polarographic determination employs 6 *N* ammonia as fundamental solution. The stated accumulation procedure permits the determination of thallium in practically all organic or inorganic materials specifically and with high sensitivity.

Résumé

Considération critique des possibilités d'isolement de traces de thallium. Recherches sur l'extraction par l'ether des phases chlorhydrique, bromhydrique

et iodhydrique. Il est possible de séparer quantitativement le thallium par extraction par l'éther isopropylique d'une solution 3 N d'acide bromhydrique en présence de quantités élevées de fer, de cuivre, de zinc et d'autres métaux réagissant avec la dithizone ainsi que des métaux alcalins et alcalino-terreux. Les traces de thallium en quantités comprises entre 1 et 1000 μg sont déterminées après leur isolement par microiodométrie ou polarographie. Le dosage polarographique est effectué dans une solution d'ammoniaque 6 N. La technique d'enrichissement décrite permet de doser le thallium avec spécificité et grande sensibilité dans la plupart des milieux organiques ou minéraux.

Literatur

[1] *H. B. Knowles*, Analyt. Chemistry **21**, 1539 (1949).

[2] *G. Haupt* und *A. Olbrich*, Z. analyt. Chem. **132**, 161 (1951).

[3] *L. A. Haddock*, Analyst **60**, 394 (1935).

[4] *K. Bambach*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **12**, 63 (1940).

[5] *G. S. Winn*, *E. L. Godfrey* und *K. W. Nelson*, Arch. Ind. Hyg. Occupat. Med. **6**, 14 (1952); Chem. Abstr. **46**, 11290 (1952).

[6] *Z. Zábranský*, Proc. I. Intern. Polarogr. Congr. Prag, III, 495 (1951).

[7] *E. B. Sandell*, Colorimetric Determination of Traces of Metals. 1944. S. 408.

[8] *A. A. Noyes*, *W. C. Bray* und *E. B. Spear*, J. Amer. Chem. Soc. **30**, 489, 515, 559 (1908).

[9] *E. L. Baldeschweiler*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **4**, 101 (1932).

[10] *P. A. Shaw*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **5**, 93 (1933).

[11] *I. Wada* und *R. Ishii*, Bull. Inst. Phys. Chem. Research Tokyo **13**, 264 (1934).

[12] *H. M. Irving* und *F. J. C. Rosotti*, Analyst **77**, 801 (1952).

[13] *R. Bock*, *H. Kusche* und *E. Bock*, Z. analyt. Chem. **138**, 167 (1953).

[14] *K. Lounamaa*, Z. analyt. Chem. **147**, 198 (1955).

[15] *G. Jantsch*, *A. H. Kroupa* und *J. Gansinger*, Z. analyt. Chem. **128**, 451 (1948).

[16] *W. Kilian*, Erzmetall **3**, 281 (1950).

[17] *F. Ensslin*, *H. Dreyer* und *K. Abraham*, Metall und Erz **39**, 184 (1942).

Laboratoire de Recherches micro-analytiques. E. N. S. C. P., 11, Rue Pierre Curie. Paris. 5

Etude des acides aminés sur une goutte de solution aqueuse par spectrographie infrarouge*

Par

Clément Duval

(Reçu le 14 janvier 1957)

J'ai indiqué[1] l'essentiel d'une nouvelle technique permettant d'enregistrer le spectre infrarouge d'une goutte de solution aqueuse de $^1/_{100}$ ml contenant quelques microgrammes de substance, en opérant dans la région 6—15 microns et en confectionnant la cuve avec deux lamelles de bromo-iodure de thallium. Depuis cette date, nous avons étudié, en collaboration avec Mlle *Yvette Servigne* les principaux ions de la chimie minérale[2], l'influence qu'ils exercent en mélange, déterminé leur limite de dilution, donné les bases d'une nouvelle technique, la microcinétique, suivi une expérience de catalyse et donné une nouvelle représentation des sels d'uranyle. Nous poursuivons cette étude par les amino-acides les plus importants pris dans différents milieux.

Etude des spectres des amino-acides

Nous avons commencé l'enregistrement des spectres des amino-acides suivants:

Glycocolle	Ornithine
Alanine	*l*-Cystine
Acide glutamique	*dl*-Phénylalanine
Glutamine	Sarcosine
Acide aspartique	Proline
l-Asparagine	Histidine
d-Arginine	Tyrosine
d-Lysine	Tryptophane
Sérine	

* A M. le Professeur de l'Université Dr. *Hans Lieb* à l'occasion de son 70ème anniversaire.

à l'état sec (pour mémoire), en solution aqueuse neutre, en solution acide chlorhydrique, vers p_H 1—2, en solution basique (soude) vers p_H 9—10.

Le but initial de cette étude est de distinguer dans une goutte, et éventuellement de doser, les constituants d'un hydrolysat de protéine sans être obligé d'effectuer la chromatographie de partage à deux dimensions.

Dans chaque spectre et pour un milieu donné nous relevons une bande-clé. Puis, nous associons les amino-acides deux par deux, trois par trois, etc., pour juger des interférences possibles. Voici les premiers résultats spectrographiques obtenus.

Tous les amino-acides donnent à sec une bande forte à 1400 cm^{-1} et souvent aussi en solution.

N'ont rien donné en solution: la *dl*-phénylalanine, la *l*-cystine et le tryptophane. L'acide aspartique ne fournit rien en solution neutre et alcaline. Il convient d'insister tout de suite sur la faiblesse du nombre de bandes en solution. Ainsi, la proline fournit 19 bandes à sec dans la région étudiée, mais une seule bande à 1245 cm^{-1} en milieu chlorhydrique, p_H 1,2 et une seule bande (la même) en milieu neutre ou basique, p_H 9,6 à 10.

D'ailleurs, plus la formule de l'amino-acide se complique, plus le spectre est pauvre en solution. Le glycocolle, le plus simple des amino-acides, présente 7 bandes dans chaque milieu.

Voici les fréquences mesurées avec les techniques annoncées.

Glycocolle

à sec	699 (F), 892 (F), 910 (F), 928 (aF), 1035 (F), 1115 (F), 1130 (aF), 1326 (aF), 1408 (aF), 1510 (aF), 1599 (aF)
solution aqueuse p_H 6,0—6,8	895 (aF), 927 (aF), 1033 (aF), 1123 (F), 1326 (F), 1408 (F), 1510 (F)
solution acide p_H 1,2	1051 (f), 1125 (aF), 1257 (F), 1326 (aF), 1408 (aF), 1510 (aF)
solution basique p_H 9,6—10,0	897 (f), 927 (f), 1033 (aF), 1123 (aF), 1326 (F), 1408 (F), 1510 (aF)

Alanine

à sec	773 (F), 850 (TF), 918 (F), 1016 (TF), 1115 (F), 1153 (F), 1235 (F), 1300 (F), 1360 (TF), 1408 (TF), 1456 (TF), 1510 (F)
solution aqueuse p_H 6,0—6,8	1115 (aF), 1218 (aF), 1300 (aF), 1355 (aF), 1375 (aF), 1408 (aF), 1456 (aF), 1500 (aF)
solution acide p_H 1,2	1118 (aF), 1220 (aF), 1257 (F), 1456 (aF)
solution basique p_H 9,8—10,0	1115 (aF), 1218 (aF), 1300 (aF), 1355 (aF), 1375 (aF), 1408 (aF), 1456 (aF)

Acide glutamique

à sec	744—750 (f), 783 (aF), 819 (F), 860 (F), 910 (aF), 987 (f), 1022 (aF), 1079 (aF), 1138—1164—1180 (aF), 1273—1308 (F), 1370 (aF), 1423—1456 (aF), 1155 (F), 1675 (aF)
solution aqueuse p_H 7,0	1400 (aF)
solution acide p_H 1	1227 (aF)
solution alcaline p_H 10	1400 (aF)

Glutamine

à sec	779 (F), 809 (TF), 850 (F), 897 (aF), 926 (aF), 999 (TF), 1053 (TF), 1088 (F), 1105 (aF), 1134 (aF), 1167 (TF), 1205 (F), 1257 (f), 1280 (aF), 1325—1327 (TF), 1350 (F), 1410 (F), 1456 (f), 1483 (TF), 1597 (f), 1633 (TF)
solution aqueuse p_H 5,2—6,0	1312 (aF), 1347 (aF), 1408 (aF)
solution acide	rien
solution basique	rien

Acide aspartique

à sec	800 (f), 853 (aF), 894 (aF), 987 (aF), 1072 (aF), 1117 (aF), 1142 (aF), 1212 (aF), 1307 (aF), 1345 (aF), 1371 (aF), 1392 (f), 1504 (F), 1610 (F)
solution aqueuse	insoluble
solution acide	1214 (f), 1250 (f)
solution basique	rien

l-Asparagine

à sec	800 (f), 805 (F), 836 (F), 886 (aF), 908 (aF), 923 (f), 943 (aF), 1076 (aF), 1105 (aF), 1123 (aF), 1150 (F), 1233 (F), 1309 (F), 1357 (F), 1431 (F), 1525 (F), 1633 (F)
solution aqueuse	insoluble
solution acide p_H 1,2	1227 (f), 1257 (f), 1420 (aF)
solution alcaline p_H 9,6	1408 (aF)

d-Arginine

à sec	747 (f), 793 (f), 852 (f), 923 (f), 1007 (F), 1080 (aF), 1117—1135 (aF), 1186 (aF), 1326 (F), 1376 (aF), 1423 (aF), 1555 (F), 1599 (f), 1675 (aF)
solution aqueuse p_H 7,0	1310 (f), 1350 (aF), 1405 (aF)
solution acide p_H 2,0	1250 (f), 1350 (f), 1408 (aF)
solution basique p_H 9,6	1308 (f), 1365 (f), 1408 (aF), 1560 (aF)

d-Lysine

à sec	744 (f), 816 (f), 822 (F), 853 (f), 885 (aF), 930 (f), 958 (aF), 1056 (aF), 1129 (aF), 1180 (f), 1200 (aF), 1405 (aF), 1514 (aF), 1524 (aF)

solution aqueuse p_H 7,0	1340 (f), 1402 (aF), 1525 (f)
solution acide p_H 2,0	1011 (aF), 1142 (F), 1180 (aF), 1240 (F), 1284 (f), 1402 (f), 1471 (f), 1518 (TF), 1723 (aF)
solution basique p_H 9,0	1340 (f), 1402 (aF), 1525 (f)

Sérine

à sec	728 (aF), 814 (f), 826 (f), 848 (f), 900 (aF), 979 (aF), 1028 (F), 1091 (aF), 1148 (f), 1160 (f), 1180 (f), 1240 (aF), 1307 (F), 1346 (F), 1425 (F), 1503 (F), 1564 (F), 1635 (F)
solution aqueuse p_H 6,0	1350 (f), 1402 (aF)
solution acide p_H 1,2	1235 (f)
solution basique p_H 9,0	1340 (aF), 1402 (aF)

Ornithine

à sec	741 (aF), 762 (F), 775 (f), 790 (f), 805 (aF), 831 (aF), 940 (TF), 984 (TF), 1016 (aF), 1042 (F), 1063 (F), 1090 (aF), 1135 (aF), 1148 (aF), 1200 (TF), 1249 (aF), 1345 (aF), 1423 (aF), 1497 (TF), 1599 (TF), 1718 (TF)
solution neutre p_H 7,0	1410 (f), 1525 (f)
solution acide p_H 1,0	1148 (aF), 1193 (aF), 1249 (TF), 1405 (aF), 1539 (aF)
solution alcaline p_H 9,6—10,0	1410 (f), 1560 (f)

l-Cystine

à sec	674 (aF), 778 (F), 846 (TF), 874 (F), 963 (F), 1042 (F), 1090 (F), 1125 (F), 1195 (F), 1298 (TF), 1336 (TF), 1408 (TF), 1484 (TF), 1579 (TF)
solution aqueuse	rien
solution acide	rien
solution basique	rien

dl-Phénylalanine

à sec	697 (f), 743 (f), 774 (f), 850 (f), 1072 (f), 1302 (aF), 1338 (f), 1402 (aF), 1495 (aF), 1575 (aF)
solution aqueuse	rien
solution acide	rien
solution alcaline	rien

Sarcosine

à sec	697 (aF), 895 (F), 923 (f), 972 (F), 990 (aF), 1061 (F), 1144 (aF), 1167 (f), 1282 (f), 1301 (F), 1380 (F), 1462 (aF), 1609 (TF)
solution aqueuse p_H 6,0	924 (f), 960 (f), 988 (f), 1049 (aF), 1312 (F), 1402 (TF), 1462 (aF)

solution acide p_H 2,0	960 (f), 987 (f), 1047 (f), 1250 (aF), 1310 (aF), 1402 (F), 1462 (aF)
solution alcaline p_H 9,0	958 (f), 987 (f), 1047 (aF), 1310 (aF), 1402 (F), 1462 (aF)

Proline

à sec	786 (f), 795 (f), 849 (F), 903 (aF), 914 (aF), 947 (aF), 983 (aF), 1038 (F), 1052 (f), 1085 (F), 1172 (F), 1257 (aF), 1290 (F), 1340 (f), 1380 (aF), 1408 (f), 1444 (f), 1566 (F), 1602 (F)
solution aqueuse p_H 6,8	1410 (aF)
solution acide p_H 1,2	1265 (aF)
solution alcaline p_H 9,6—10,0	1410 (aF)

Histidine

à sec	696 (aF), 809 (aF), 820 (F), 833 (aF), 868 (aF), 875 (f), 918 (aF), 959 (aF), 975 (aF), 1066 (aF), 1076 (f), 1123 (f), 1144 (f), 1167 (aF), 1184 (aF), 1207 (f), 1260 (aF), 1283 (aF), 1310 (aF), 1338 (F), 1413 (aF), 1430 (f), 1492 (aF), 1582 (aF), 1615 (aF), 1630 (aF)
solution aqueuse p_H 5,0	1340 (aF), 1402 (aF), 1533 (f)
solution acide p_H 2,0	1402 (aF)
solution basique p_H 9,0	1340 (aF), 1402 (aF), 1504 (f)

Tyrosine

à sec	714 (aF), 743 (TF), 795 (f), 801 (f), 829 (f), 840 (TF), 851 (f), 878 (TF), 897 (aF), 940 (aF), 985 (aF), 1017 (aF), 1044 (F), 1101 (F), 1111 (f), 1159 (aF), 1175 (aF), 1202 (aF), 1220 (aF), 1245 (TF), 1328 (TF), 1364 (TF), 1423 (F), 1456 (F), 1511 (F), 1568 (TF)
solution aqueuse	insoluble
solution acide p_H 1,2	1241 (aF)
solution alcaline p_H 9,6—10,0	1273 (aF), 1500 (aF)

Tryptophane

à sec	747 (TF), 769 (f), 802 (f), 850 (f), 857 (f), 866 (f), 876 (f), 918 (aF), 961 (aF), 987 (aF), 1007 (aF), 1080 (f), 1101 (aF), 1148 (f), 1229 (aF), 1348 (aF), 1408 (aF), 1568 (F)
solution aqueuse	rien
solution acide	rien
solution basique	rien

Voici maintenant le tableau des bandes-clés sélectionnées pour ceux des corps précédents qui donnent un spectre en solution.

Amino-acide	Milieu neutre	Milieu acide	Milieu basique
Glycocolle	895 et 927	1051	896 et 927
Alanine	1218	1220	1218
Acide glutamique	—	1227	—
Glutamine	1312 et 1347	—	—
Acide aspartique	—	1214	—
d-Lysine	1340 et 1525	1142 et 1518	1340 et 1525
Arginine	1310 et 1350	1350	1308 et 1560
Sérine	1350	1235	1340
Ornithine	1525	1148 et 1249	1560
Sarcosine	960 et 1310	960 et 1310	960 et 1310
Proline	—	1245	—
Histidine	1340 et 1533	—	1340 et 1504
Tyrosine	—	1241	1273 et 1500

Etude du mélange glycocolle-alanine

Nous distinguerons trois cas suivant que le mélange est effectué à p_H 6, à p_H 1,2 ou à p_H 10.

p_H 6 895 (f), 924 (f), 1025 (aF), 1117 (aF), 1218 (aF), 1300 (aF), 1326 (F), 1358 (aF), 1408 (F), 1510 (aF).

L'enregistrement de ce spectre nous amène aux résultats suivants:

a) Les bandes de 1408 et 1510 cm^{-1} communes aux deux constituants demeurent dans leur mélange;

b) la bande 1123 cm^{-1} du glycocolle et 1115 cm^{-1} de l'alanine se fusionnent en une bande unique à 1117 cm^{-1};

c) les bandes 895, 924, 1033 (déplacée à 1025) et 1326 cm^{-1} du glycocolle se conservent dans le mélange; les deux premières toutefois n'apparaîssent qu'en solution saturée;

d) les bandes 1218, 1300, 1355 (déplacée à 1358) de l'alanine se conservent en mélange;

e) les bandes 1375 et 1456 de l'alanine disparaîssent complètement en mélange, en solution saturée ou diluée.

p_H 1,2 1117 (aF), 1257 (F), 1326 (aF), 1408 (aF), 1510 (aF).

La considération de ce spectre comparé à celui des composants individuels pris dans le même milieu chlorhydrique nous permet de tirer les faits suivants:

a) les bandes 1257 cm^{-1} se conservent seules en mélange et à grande dilution;

b) comme à p_H 6,0, la bande 1125 du glycocolle et la bande 1118 de l'alanine se fusionnent en la bande 1117 cm^{-1} qui ne se maintient d'ailleurs qu'en solution très concentrée;

c) les bandes 1220 et 1456 cm^{-1} de l'alanine disparaîssent même en solution concentrée;

d) la bande 1051 du glycocolle ne se maintient pas dans le mélange; par contre, la bande 1326 cm^{-1} persiste longtemps par dilution.

p_H 10 – 1300 (f), 1326 (aF), 1410 (F), 1510 (f).

Le spectre est beaucoup plus simple que les deux précédents et nous permet de dire immédiatement:

a) les bandes au-dessous de 1300 cm^{-1} chez les constituants individuels disparaissent en mélange. La bande commune 1408—1410 se conserve;

b) se conservent aussi la bande 1300 de l'alanine, les bandes 1326 et 1510 du glycocolle;

c) les bandes 1375 et 1456 de l'alanine disparaîssent encore en mélange.

Cet ensemble de faits nous permet de distinguer aisément dans une goutte de $^1/_{100}$ ml le glycocolle et l'alanine mélangés et quel que soit le milieu.

Etude du mélange glycocolle-acide glutamique

Comme l'acide glutamique est insoluble dans l'eau, nous n'avons à envisager cette fois que les milieux acide et basique.

p_H 1,2 1138 (f), 1327 (F), 1405 (F), 1510 (F).

L'enregistrement de ce spectre nous amène aux conclusions suivantes:

a) l'unique bande à 1227 cm^{-1} de l'acide glutamique disparaît en mélange; les 4 bandes énumérées ci-dessus sont dues au glycocolle; les bandes 1051 et 1457 de celui-ci ont disparu;

b) la bande 1125 cm^{-1} se déplace à 1138 et ne se montre qu'en solution saturée. Les bandes 1327, 1405 et 1510 cm^{-1} sont ultimes et persistent par dilutions successives.

p_H 10 1138 (f), 1327 (F), 1405 (F), 1510 (F).

Ce spectre conduit aux remarques suivantes:

a) le spectre du mélange glycocolle-acide glutamique est identique en milieu acide ou basique;

b) la bande 1408 du glycocolle et 1400 de l'acide glutamique se confondent en une bande unique à 1405 cm^{-1}. On ne peut donc pas distinguer l'acide en mélange;

c) les 4 bandes 897, 927, 1033 et 1123 du glycocolle disparaîssent en mélange. La bande 1123 se déplace à 1138 cm^{-1}.

Tels sont les premiers résultats obtenus en vue d'un tableau systématique d'analyse des amino-acides sur une goutte de solution.

Résumé

L'auteur donne les spectres infrarouges des solutions neutres, acides et basiques d'un certain nombre d'amino-acides; il fournit les bandes-clés utiles pour un futur dosage et examine l'influence de l'alanine et de l'acide glutamique quand on les mélange au glycocolle.

Zusammenfassung

Die Infrarotspektren neutraler, saurer und basischer Lösungen einer Reihe von Aminosäuren werden angegeben. Die für die künftige Bestimmung geeigneten Schlüsselbanden wurden festgestellt und der Einfluß von Alanin und Glutaminsäure in Mischungen mit Glykokoll untersucht.

Summary

The infra red spectra of neutral, acid, and basic solutions of a certain number of amino acids are given. The author also provides the key bands to be used for a future determination. He examines the influence of alanine and glutamic acid when they are mixed with glycine.

Bibliographie

[1] *C. Duval*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 741.

[2] *C. Duval*, Conférence d'ouverture au Groupement d'analyse par méthodes spectroscopiques (GAMS), le 17 septembre 1956 (sous presse).

Chemistry Department, The Queen's University of Belfast, Northern Ireland

Chemical Analysis on the Microgram Scale. V*

Separation and Identification of Cerium, Thorium, Lead, Calcium, Strontium, and Barium

By

(Mrs.) **Jean K. Thompson** and **Cecil L. Wilson**

(Received January 28, 1957)

In the non-H_2S scheme of qualitative analysis already described[1] the elements cerium, thorium, lead, calcium, strontium and barium are precipitated, together with titanium and zirconium, in Group III. The combined precipitate is then separated, and cerium, thorium, titanium and zirconium are removed in Group III A, the remainder of the elements forming Group III B. Titanium and zirconium are incompletely precipitated by the Group reagent, the remainder appearing in Group V. On the microgram scale it is in practice more convenient to exclude these elements from consideration at the Group III stage, and they will be considered further in a subsequent publication.

The remaining elements can be separated and identified on the microgram scale using the techniques already described[2], and applied to the elements in Group II of the non-H_2S scheme[3].

The principal considerations on which the original scheme on the milligram scale has been modified for work on the microgram scale are as follows:

1. Although appreciable amounts of titanium and zirconium may be precipitated in Group III on the milligram scale, only a very small proportion was found to precipitate on the smaller scale. Any such precipitate was therefore redissolved and returned to the main Group IV solution for subsequent identification in Group V.

---

* Dedicated to Prof. Dr. *Hans Lieb* on occasion of his 70th birthday.

2. Difficulty was found in dissolving the cerium precipitate in water, and hence in removing it by water-washing as in the original scheme. To a less extent the thorium precipitate was difficult to separate completely. Dilute hydrochloric acid, which was a more efficient extractant, was used. This, however, involved modified treatment of the precipitates of the other elements.

3. Ammonium carbonate was an inefficient precipitant for calcium and an alternative method of precipitation was devised.

4. Conversion of barium sulphate to barium carbonate required considerably more vigorous treatment than on the milligram scale.

Experimental

The scheme finally adopted for the resolution of the elements is given below:

Reagents:

Hydrochloric acid, 10 *N*, 5 *N*, 2 *N*.
Nitric acid, 2 *N*.
Ammonia, 2 *N*.
Ammonium acetate, 10 per cent aqueous.
Ammonium oxalate, 10 per cent aqueous.
Ammonium sulphate, 10 per cent aqueous.
Ethanol.
Oxalic acid, sat. aqueous.
Sodium carbonate, sat. aqueous.
Sodium hydroxide, 2 *N*.
Sodium sulphate, sat. aqueous.

Confirmatory Tests

Except where otherwise indicated, confirmatory tests are based on those used in the milligram procedures described elsewhere[1,4].

Lead

1. *Potassium Chromate Test*[3].
2. *Triple Thiocyanate Test*[5].

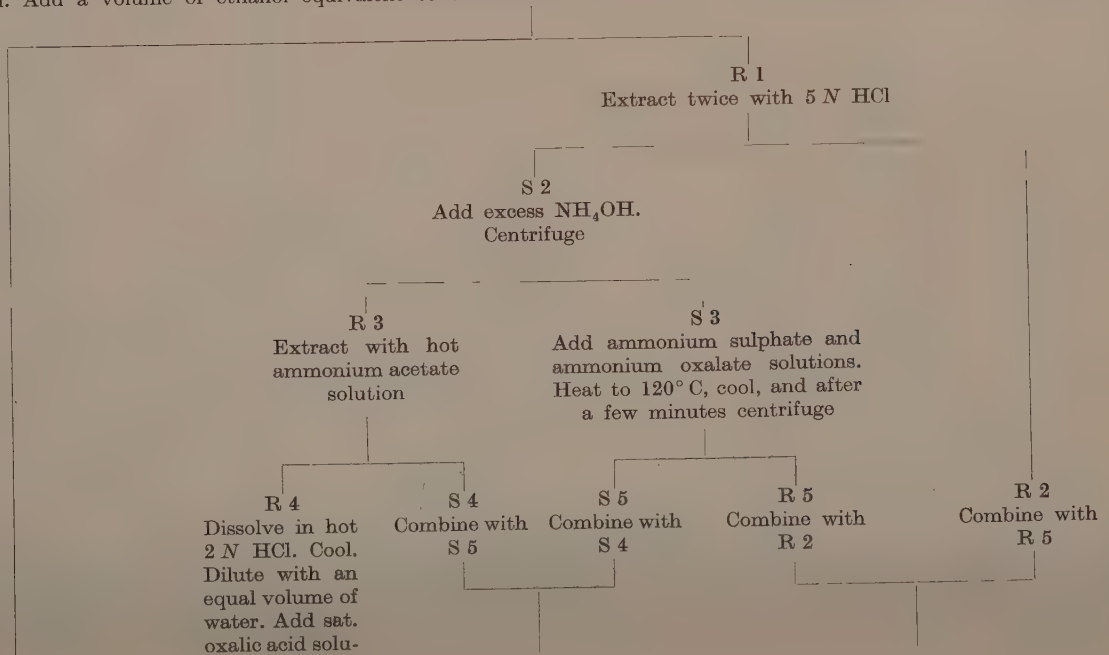
Reagents: Potassium thiocyanate: 80 per cent aqueous. Potassium mercuric thiocyanate: 25 per cent aqueous. Zinc sulphate: sat. aqueous.

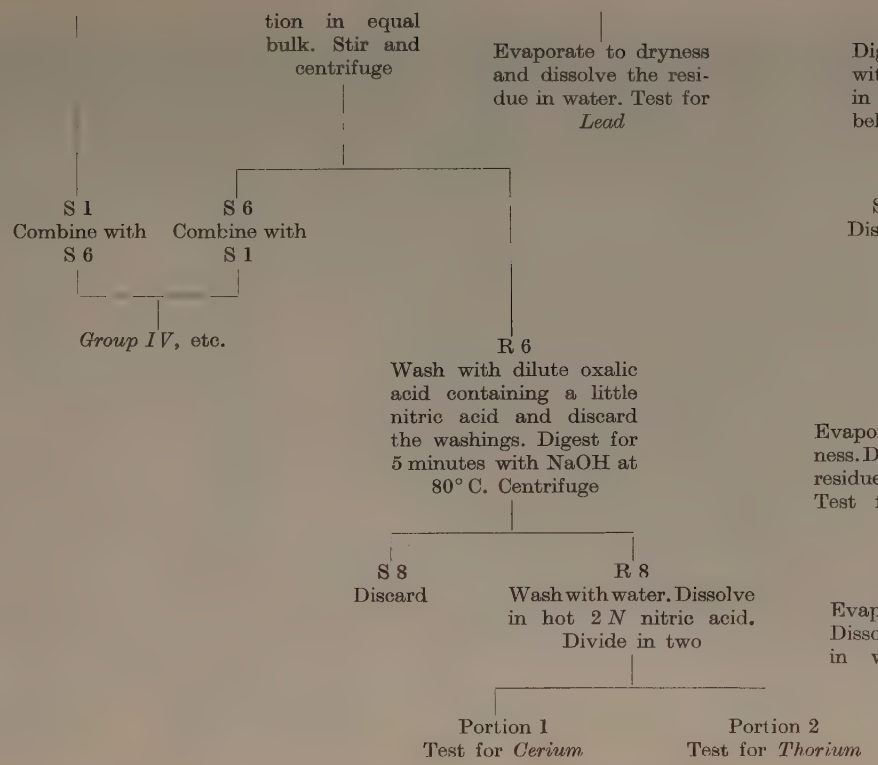
Procedure: Treat 20–30 nl* of test solution in a capillary cone with about half its volume of potassium thiocyanate solution followed by

* 1 nl = 10^{-9} l.

Group III

Evaporate the filtrate[3] from Group II to the original bulk if necessary. Add an equal volume of saturated sodium sulphate solution. Add a volume of ethanol equivalent to the total bulk of the solution. Heat to 60° C. Cool and centrifuge.


R 1
Extract twice with 5 N HCl
S 2
Add excess NH_4OH.
Centrifuge
R 3
Extract with hot ammonium acetate solution
S 3
Add ammonium sulphate and ammonium oxalate solutions. Heat to 120° C, cool, and after a few minutes centrifuge
R 4
Dissolve in hot 2 N HCl. Cool. Dilute with an equal volume of water. Add sat. oxalic acid solu-
S 4
Combine with S 5
S 5
Combine with S 4
R 5
Combine with R 2
R 2
Combine with R 5


tion in equal bulk. Stir and centrifuge
Evaporate to dryness and dissolve the residue in water. Test for *Lead*
Digest for 10 minutes with sat. Na_2CO_3 solution in a sealed capillary just below 100° C. Centrifuge
S 1
Combine with S 6
S 6
Combine with S 1
Group IV, etc.
S 7
Discard
R 7
Wash, dissolve in 2 *N* HNO_3, and evaporate to dryness. Extract twice with ethanol
R 6
Wash with dilute oxalic acid containing a little nitric acid and discard the washings. Digest for 5 minutes with NaOH at 80° C. Centrifuge
S 9
Evaporate to dryness. Dissolve white residue in water. Test for *Calcium*
R 9
Evaporate twice to dryness with 10 *N* HCl. Extract twice with ethanol
S 8
Discard
R 8
Wash with water. Dissolve in hot 2 *N* nitric acid. Divide in two
S 10
Evaporate to dryness. Dissolve white residue in water. Test for *Strontium*
R 10
Dissolve white residue in water. Test for *Barium*
Portion 1
Test for *Cerium*
Portion 2
Test for *Thorium*

small amounts of potassium mercuric thiocyanate and zinc sulphate solutions. If lead is present the precipitate which forms is yellow. Carry out a blank to distinguish from the white precipitate obtained when lead is absent.

Calcium

1. *Ammonium Oxalate Test.*

Reagent: Ammonium oxalate: sat. aqueous.

Procedure: To about 25 nl of test solution in a cone add a small amount of ammonium oxalate solution. A white precipitate indicates calcium.

2. *Potassium Ferrocyanide Test.*

Reagents: Potassium ferrocyanide: sat. aqueous. Ammonium chloride: solid.

Procedure: Add about 25 nl of the test solution to a cone containing a few crystals of ammonium chloride. Add a small amount of potassium ferrocyanide solution. A white precipitate indicates calcium.

Strontium

1. *Sodium Rhodizonate Test.*

Reagents: Sodium rhodizonate: Freshly prepared 1 per cent aqueous. Hydrochloric acid: 0.1 *N*.

Procedure: Impregnate a piece of filter paper with the sodium rhodizonate. Add about 25 nl of the test solution. Observe the paper, either by holding it up to the light or by placing it on the edge of the carrier of the moist cell and observing it through the microscope. A red-brown spot, which is removed by dilute hydrochloric acid, indicates strontium.

2. *Potassium Dichromate Test.*

Reagents: Acetic acid: 2 *N*. Potassium dichromate: 10 per cent. Ammonium hydroxide: 2 *N*.

Procedure: Acidify 25 nl in a cone with acetic acid. Add potassium dichromate solution followed by ammonium hydroxide solution. A precipitate which forms after the addition of the ammonium hydroxide indicates strontium.

Barium

1. *Sodium Rhodizonate Test.*

Procedure: Carry out the sodium rhodizonate test as described for strontium. A red-brown spot not removed by dilute hydrochloric acid indicates barium.

2. *Potassium Dichromate Test.*

Procedure: Carry out the potassium dichromate test as described for strontium but without the addition of ammonium hydroxide. A yellow precipitate indicates barium.

Cerium

1. *Hydrogen Peroxide Test.*

Reagents: Hydrogen peroxide: 30-volume. Ammonium hydroxide: 2 *N*.

Procedure: Place about 25 nl of the test solution in a cone. Add a little hydrogen peroxide and make alkaline with ammonium hydroxide. A yellow-brown precipitate indicates cerium.

2. *Benzidine Test.*

Reagents: Sodium hydroxide: 2 *N*. Benzidine: Dissolve 0.05 g benzidine in 10 ml glacial acetic acid and dilute to 100 ml with water.

Procedure: Impregnate a piece of filter paper with sodium hydroxide. Add about 25 nl of the test solution, followed by an equal amount of benzidine solution. Observe as for the sodium rhodizonate test. A blue spot indicates cerium.

Thorium

1. *Potassium Iodate Test.*

Reagents: Nitric acid: Concentrated. Potassium iodate: sat. aqueous.

Procedure: To about 25 nl in a cone add twice the bulk of nitric acid. Add a volume of the iodate solution equal to the volume of nitric acid added. A white precipitate indicates thorium.

2. *Alizarin Test.*

Reagents: Hydrochloric acid: concentrated. Alizarin: 1 per cent ethanolic.

Procedure: Centrifuge the iodate precipitate, and wash with dilute potassium iodate solution containing a little nitric acid. Add about 100 nl of hydrochloric acid to the cone, and evaporate to dryness. Dissolve the residue in about 50 nl of water. Transfer the solution to a piece of filter paper. Add a drop of alizarin solution. A violet spot indicates thorium.

Summary

The separation and identification of cerium, thorium, lead, calcium, strontium and barium on the microgram scale are described, these elements being treated as Group III of a non-H_2S schematic analysis.

Zusammenfassung

Die Trennung und Identifizierung von Cer, Thorium, Blei, Calcium, Strontium und Barium im Mikrogramm-Maßstab werden beschrieben. Diese Elemente werden als 3. Gruppe eines Analysenganges ohne Schwefelwasserstoff zusammengefaßt.

Résumé

Description de la séparation et l'identification du cerium, du thorium, du plomb, du calcium, du strontium et du baryum à l'échelle du microgramme, ces éléments faisant partie du troisième groupe d'un schéma analytique non fondé sur la précipitation par l'hydrogène sulfuré.

References

[1] *H. El-Badry, F. R. McDonnell* and *C. L. Wilson*, Analyt. Chim. Acta **4**, 440 (1950).

[2] *H. El-Badry* and *C. L. Wilson*, Mikrochem. **40**, 141 (1953).

[3] *H. El-Badry* and *C. L. Wilson*, Mikrochem. **40**, 218 (1953).

[4] *R. Belcher* and *C. L. Wilson*, Qualitative Inorganic Microanalysis. London: Longmans, Green and Co. 1946.

[5] *F. Sierra* and *J. Sierra*, Mon. farm. y terap. Madrid **54**, 171 (1948): Chem. Abstr., **42**, 6699 (1948).

Laboratorio da Produçao Mineral — Ministerio da Agricultura,
Rio de Janeiro, Brasilien

Beiträge zur organischen Tüpfelanalyse*

Von

F. Feigl, V. Gentil und **C. Stark-Mayer**

(Eingegangen am 4. Februar 1957)

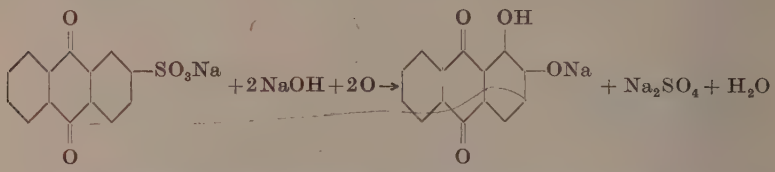
Lieb und *Schöniger*[1] haben in ihrer „Anleitung zur Darstellung Organischer Präparate mit kleinen Substanzmengen" im Anschluß an die genaue Beschreibung einschlägiger Verfahren Tüpfelreaktionen angeführt, die für bestimmte Nichtmetalle und funktionelle Gruppen in organischen Verbindungen charakteristisch sind. Derartige, mit minimalen Substanzmengen schnell durchführbare Nachweise können präparative Arbeiten begleiten und damit zusätzliche Kenntnisse über Reaktionsweisen organischer Verbindungen vermitteln. Durch die Anführung sowohl präparativer als auch analytischer Arbeitsvorschriften haben die Autoren als erste in einem für Studierende bestimmten Laboratoriumsbuch didaktisch wichtige Beziehungen berücksichtigt, die in der organischen Chemie zwischen Synthese und Analyse bestehen. Seit Erscheinen ihres Buches (1950) ist die organische Tüpfelanalyse durch Verbesserung bekannter und Beschreibung neuer Nachweise wesentlich erweitert worden[2]. Für diesbezügliche Forschungsarbeiten waren Erfahrungen und Überlegungen der Chemie der spezifischen, selektiven und empfindlichen Reaktionen[3] richtunggebend, auf die an anderer Stelle hingewiesen worden ist[4]. Das gleiche gilt für die nachfolgenden Beiträge zur organischen Tüpfelanalyse, denen die analytische Verwertung teils bekannter, teils unbekannter Umsetzungen organischer Verbindungen zugrunde liegt und die deshalb — gegebenenfalls auch als Vorlesungsversuche — für den chemischen Unterricht von Interesse sein dürften.

I. Nachweis von Anthrachinonsulfosäure

Die klassische Synthese des Alizarins (1869, *Graebe, Liebermann, Perkin*), deren Ausführung in cg-Mengen von *Lieb* und *Schöniger* (loc.

* Herrn Univ.-Prof. Dr. *Hans Lieb* zum 70. Geburtstag gewidmet.

cit., S. 121) beschrieben wird, beruht auf dem trockenen Erhitzen von anthrachinonsulfosaurem Natrium mit Alkalihydroxyd unter Zugabe von Alkalinitrat oder -chlorat als Oxydans gemäß:



Die Überführung der farblosen Sulfosäure in rotviolettes Alkalisalz des Alizarins erfolgt bereits mit Mikrogrammengen und gestattet dadurch den Nachweis von Anthrachinonmonosulfosäure. In analoger Weise werden auch von Anthrachinondi- und -tri-sulfosäure Polyhydroxyverbindungen mit orthoständigen Hydroxygruppen gebildet.

Arbeitsweise: In der Vertiefung einer Tüpfelplatte wird eine minimale Menge der festen Probe oder 1 Tropfen ihrer wäßrigen Lösung nach Zugabe eines Tropfens einer Lösung von 1 g Natriumnitrat in 10 ml 20%iger Natronlauge zunächst zur Trockne verdampft; hierauf wird einige Minuten auf 160 bis 180° erhitzt (Heizplatte). Je nach der Menge an Anthrachinonsulfosäure nimmt die Salzmasse eine mehr oder weniger intensive, rotviolette Farbe an.

Erfassungsgrenze: 2 μg Anthrachinon-2-sulfosäure.

II. Nachweis sekundärer Alkoholgruppen

An anderer Stelle ist ein empfindlicher und spezifischer Nachweis elementaren Schwefels beschrieben worden[5], der darauf beruht, daß der beim Verschmelzen mit Benzoin auf 120° C gemäß

$$C_6H_5 \cdot CHOH \cdot CO \cdot C_6H_5 + S \rightarrow C_6H_5 \cdot CO \cdot CO \cdot C_6H_5 + H_2S$$

gebildete gasförmige Schwefelwasserstoff die bekannte Schwärzung von Bleiacetatpapier hervorruft. Wie zu erwarten war, erlaubt diese schnell verlaufende Umsetzung auch den Nachweis von Benzoin und entsprechend dem Prinzip der analytischen Gruppenbildung reagieren in analoger Weise zahlreiche Verbindungen, deren Molekül die sekundäre Alkoholgruppe enthält. Es handelt sich demnach um die allgemeine Umsetzung

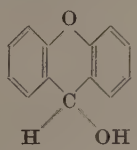
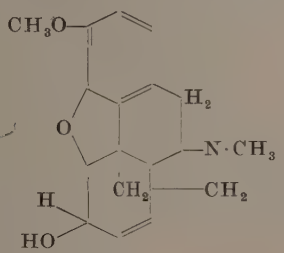
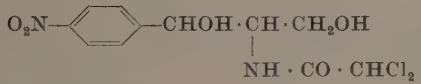
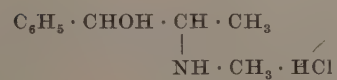
$$\begin{array}{c} | \\ CHOH \\ | \end{array} + S \rightarrow \begin{array}{c} | \\ C=O \\ | \end{array} + H_2S$$

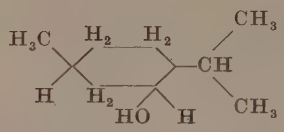
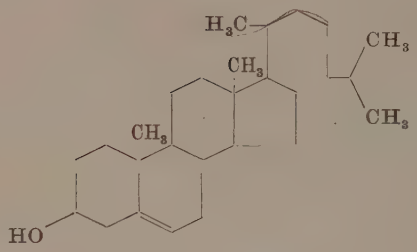
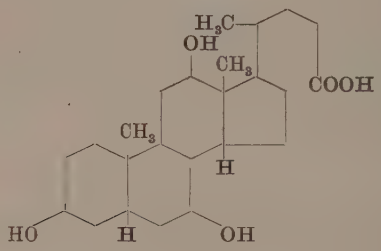
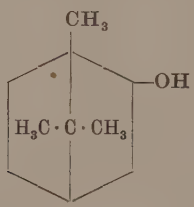
Nach den bisherigen Befunden scheinen zu dieser Redoxreaktion solche Verbindungen geeignet zu sein, die im Temperaturbereich von 120 bis 180° C schmelzen oder deren Siedepunkt oberhalb dieser Temperatur liegt. Bei Einhalten dieses Temperaturbereiches und kurzem Erhitzen besteht keine Gefahr einer Beeinträchtigung des Nachweises

durch solche Verbindungen, die bei stärkerem und längerem Erhitzen mit Schwefel Schwefelwasserstoff bilden (z. B. Fette und Wachse sowie langkettige Fettsäuren).

Arbeitsweise: Eine kleine Menge der festen Probe oder ein Tropfen ihrer Lösung in Alkohol, Äther usw. wird in einer Mikroeprouvette mit 1 Tropfen einer 2%igen Lösung von Schwefel in Schwefelkohlenstoff versetzt und durch Erwärmung das Lösungsmittel verdampft. Auf das offene Ende der Mikroeprouvette wird ein Scheibchen feuchtes Bleiacetatpapier gelegt und die Eprouvette in ein auf 150° erwärmtes Glycerinbad getaucht. Im Falle der Anwesenheit von Verbindungen mit sekundären Alkoholgruppen entsteht auf dem Papier innerhalb 2 bis 3 Minuten, gegebenenfalls bei Steigerung der Temperatur auf 180°, ein schwarzer oder brauner Fleck von Bleisulfid.

Nach obigem Verfahren waren nachweisbar:

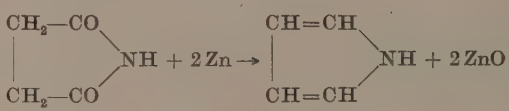
		Erhitzt auf
10 μg Benzoin	$C_6H_5 \cdot CO \cdot CHOH \cdot C_6H_5$	135—140°
20 μg Benzoinoxim	$C_6H_5 \cdot C=(NOH) \cdot CHOH \cdot C_6H_5$	150—160°
50 μg Furoin		135—150°
20 μg Xanthydrol		155°
2 μg Codein		154—160°
50 μg Chloromycetin		175°
200 μg Ephedrinhydrochlorid		180°

		Erhitzt auf
200 μg Menthol		200°
25 μg Cholesterin		180°
100 μg Cholsäure		180°
40 μg Borneol		200—210°

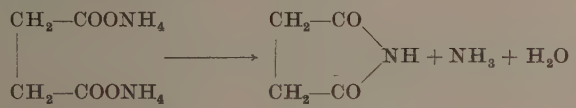
Cyklohexanol (180°), Cinchonin (180—190°), Morphin (180—190°), Adrenalin (170°), Tropin (150—155°) reagieren gleichfalls.

III. Nachweis von Succinimid und Bernsteinsäure

Die von *Bell*[6] entdeckte Bildung von Pyrrol bei der Zinkstaubdestillation von Succinimid gemäß



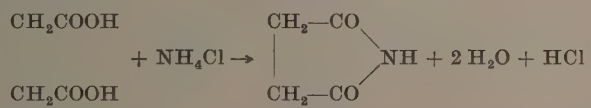
erfolgt auch bei Zinkstaubdestillation von Ammoniumsuccinat, da dieses bei trockenem Erhitzen durch Abspaltung von Wasser und Ammoniak in Succinimid übergeführt wird.



Da die von *Fischer* und *Meyer-Betz*[7] beschriebene empfindliche Farbreaktion (Violettfärbung) des Pyrrols mit salzsaurem p-Dimethylaminobenzaldehyd nicht nur mit Lösungen, sondern auch mit Dämpfen des Pyrrols eintritt, lassen sich obige Pyrolysen mit der Farbreaktion kombinieren, wodurch man zu Nachweisen von Succinimid und Bernsteinsäure gelangt, die in der Arbeitsweise der Tüpfelanalyse ausführbar sind.

Zwecks maximaler Empfindlichkeit ist die Zinkstaubdestillation bei Gegenwart von Ammoniumchlorid durchzuführen und eine trichloressigsaure statt einer salzsauren Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd zu verwenden. Der Zusatz von Ammoniumchlorid bewirkt durch die Reaktion $ZnO + 2\,NH_4Cl \rightarrow ZnCl_2 + H_2O + 2NH_3$ die Entfernung des an der Oberfläche des metallischen Zinks befindlichen Films von Zinkoxyd. Die Verwendung von Trichloressigsäure* statt Salzsäure sichert ein hitzebeständiges saures Milieu für die Pyrrolreaktion, was bei Verwendung einer salzsauren Lösung infolge Verflüchtigung dieser Säure bei der hohen Temperatur der Zinkstaubdestillation nicht der Fall ist.

Bemerkenswert ist, daß Bernsteinsäure bei trockenem Erhitzen mit Ammoniumchlorid und Zink Pyrrol bildet, sich demnach so wie Ammoniumsuccinat oder Succinimid verhält. Möglicherweise entsteht letzteres bei Sinterung der Komponenten gemäß



Es ist demnach möglich, sowohl Succinimid als auch Bernsteinsäure mittels Zinkstaubdestillation in Gegenwart von Ammoniumchlorid durch die Bildung von Pyrrol nachzuweisen.

Arbeitsweise: In einer Mikroeprouvette wird ein Tropfen der Probelösung oder eine minimale Menge der festen Substanz mit einem Tropfen 0,5%iger

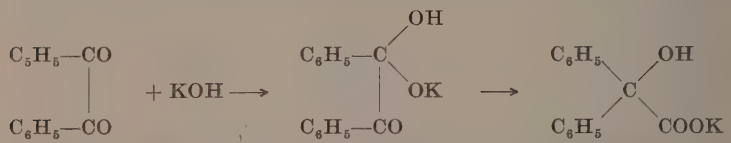
* Die Anregung zur Verwendung von Trichloressigsäure, die in vielen organischen Flüssigkeiten löslich ist und die bei manchen Farbreaktionen an Stelle konz. Mineralsäuren (insbesondere Schwefelsäure) verwendet werden kann, verdanken wir einer interessanten Studie von *Rosenthaler*[8].

Ammoniumchloridlösung und einigen mg Zink zur Trockne verdampft. Auf das offene Ende der Eprouvette wird ein Scheibchen Filterpapier gelegt, das mit einem Tropfen einer 5%igen Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd in 20%iger benzolischer Lösung von Trichloressigsäure befeuchtet wurde. Der Boden der Eprouvette wird mittels einer Mikroflamme etwa eine Minute kräftig erhitzt. Je nach der Menge Bernsteinsäure oder Succinimid entsteht auf dem Papier ein rotvioletter oder rosa Fleck.

Erfassungsgrenze: 2,5 μg Succinimid.
5 μg Bernsteinsäure.

IV. Nachweis von 1,2-Diketonen

Zum Nachweis hierhergehöriger aliphatischer und aromatischer Verbindungen sind zuerst von *Ishidate*[9] und später von anderen Autoren Verfahren ausgearbeitet worden, die in der Tüpfelanalyse verwendet werden können[10]. Diesen gegenüber besitzt das nachfolgend beschriebene Verfahren zwar keine Vorteile, doch verdient es Interesse, weil ihm der seit *Liebig*[11] bekannte Prozeß der sog. „Benzilsäureumlagerung" zugrunde liegt. Hierbei wird Benzil in der Alkalischmelze — wahrscheinlich nach primärer Anlagerung von Alkalihydroxyd — in Benzilsäure (Diphenylglykolsäure) übergeführt.



Analoge Umlagerungen, die zu Dialkyl- oder Diarylderivaten der Glykolsäure führen, erfolgen bei allen 1,2-Diketonen[12].

Es wurde gefunden, daß bereits einmaliges Abdampfen selbst minimaler Mengen von 1,2-Diketonen mit Alkalihydroxyd ausreicht, um die Benzilsäureumlagerung in analytisch nachweisbarem Ausmaß herbeizuführen. Wird der alkalische Abdampfrückstand mit verd. Salzsäure neuerlich zur Trockne verdampft, so hinterbleiben neben Alkalichlorid die freien, nichtflüchtigen, di-substituierten Glykolsäuren, die aus einer frisch bereiteten Kaliumjodid-Kaliumjodat-Lösung Jod in Freiheit setzen. Dadurch kann indirekt das in die Benzilsäureumlagerung eingetretene Diketon nachgewiesen werden. Für den Nachweis in mg-Mengen und zur Demonstration der Benzilsäureumlagerung ist dieses Verfahren ausreichend. Hingegen ist es zum sicheren Nachweis noch kleinerer Mengen nicht zu empfehlen, weil auch das reinste Alkalihydroxyd nach Abdampfen mit Salzsäure Rückstände hinterläßt, die aus sauren Kaliumjodidlösungen etwas Jod in Freiheit setzen. Wahrscheinlich handelt es sich um die Wirksamkeit oxydierender Verbindungen, die als Verunreinigungen im Alkalihydroxyd enthalten sind.

Mit größerer Sicherheit ist die Benzilsäureumlagerung bei minimalen Mengen von 1,2-Diketonen zu erkennen durch die Heranziehung eines Nachweises für in Benzol lösliche saure Verbindungen[13], der auf folgendem Effekt beruht: Wird eine verdünnte wäßrige Lösung von Uranylsalzen mit der farblosen benzolischen Lösung von Rhodamin B (welche die Lactoform des Farbstoffes enthält) geschüttelt, so bleibt die Benzolschicht unverändert. Fügt man jedoch saure benzollösliche organische Verbindungen hinzu (es genügen minimale Mengen), dann nimmt die Benzolschicht eine rote Farbe an. Es handelt sich hier wahrscheinlich darum, daß im Falle von Carbonsäuren gemäß der Gleichgewichtsreaktion

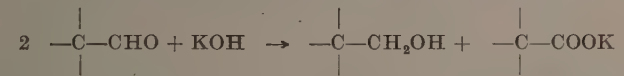
$$UO_2^{2+} + 3\,HAc \rightleftharpoons H\,[UO_2Ac_3] + 2\,H^+$$

geringe Mengen einer komplexen Uranyl-Carbonsäure entstehen, die mit dem basischen Farbstoff Rhodamin B rote benzollösliche Salze bilden. Dadurch kommt es zu einer dauernden Störung und Wiederherstellung obigen, in wäßriger Lösung bestehenden Gleichgewichtes, was den Nachweis minimaler Mengen benzollöslicher Carbonsäuren erlaubt.

Arbeitsweise: In einer Mikroeprouvette wird eine kleine Menge der Probesubstanz oder der Trockenrückstand einer Lösung mit einem Tropfen 1-n Natronlauge zur Trockne verdampft. Hierauf wird 1 Tropfen starker Salzsäure zugesetzt und neuerlich zur Trockne verdampft. Zum Rückstand wird 1 Tropfen einer 2%igen Uranylnitratlösung und 5 Tropfen einer gesättigten benzolischen Lösung von Rhodamin B zugesetzt und geschüttelt. Der positive Ausfall der Reaktion ist daran zu erkennen, daß die Benzolschicht eine rote Farbe annimmt und im UV-Licht eine orangefarbene Fluoreszenz zeigt.

Erfassungsgrenze: 1 μg Diacetyl.
2,5 μg Benzil.

Bei Verwendung des obigen Nachweises ist die Anwesenheit saurer benzollöslicher Verbindungen sowie solcher Aldehyde zu beachten, die kein α-ständiges Wasserstoffatom enthalten. Letztere unterliegen bei Einwirkung von Alkalihydroxyd der Cannizzaro-Reaktion[14]



Daher entstehen unter den Bedingungen des Nachweises Carbonsäuren, die im Falle der Löslichkeit in Benzol die Farbreaktion mit Uranylnitrat und Rhodamin B zeigen. Aus diesem Grunde ist das hier beschriebene Verfahren bei Anwesenheit insbesondere aromatischer Aldehyde nicht anwendbar. Von sauren benzollöslichen Verbindungen können Dioxoverbindungen durch Schütteln der ätherischen Lösung mit wäßerigem Alkalihydroxyd getrennt werden, wobei die Carbonsäuren als Alkalisalze in der wäßerigen Schicht verbleiben.

V. Nachweis von α-Alanin
(Unterscheidung von β-Alanin)

Frehden und *Goldschmiedt*[15] haben eine Tüpfelreaktion zum Nachweis von α-Aminosäuren darauf begründet, daß diese bei gelindem Erwärmen mit Alkalihypobromit gemäß

$$R \cdot CH(NH_2) \cdot COOH + NaBrO \rightarrow R \cdot CHO + NH_3 + CO_2 + NaBr$$

Aldehyde bilden, welche die bekannte Farbreaktion mit Fuchsinschwefligsäure[16] zeigen.

Obige Decarboxylierung und Desaminierung führt bei α-Alanin (α-Aminopropionsäure) zu Acetaldehyd, zu dessen Nachweis die von *Lewin*[17] beschriebene Farbreaktion (Blaufärbung) mit Nitroprussidnatrium und Piperidin herangezogen werden kann. Da dieser Nachweis auch mit gasförmigem Acetaldehyd gelingt und β-Alanin mit Hypobromit erwärmt keinen Acetaldehyd abspaltet, läßt sich darauf eine Unterscheidung der beiden isomeren Aminopropionsäuren begründen.

Ausgehend von der Lewin-Reaktion ist von *Feigl* und *Anger*[18] gezeigt worden, daß ihre Umkehrung zum Nachweis von Piperidin dienen kann und daß, entsprechend dem Prinzip der analytischen Gruppenwirkung, sämtliche sekundären aliphatischen Amine mit Nitroprussidnatrium und Acetaldehyd eine Blaufärbung geben und dadurch empfindlich nachweisbar sind. Es kann daher bei der Lewinreaktion auf Acetaldehyd Piperidin durch das weitaus billigere Morpholin ersetzt werden. Ein geeignetes Reagens ist eine frisch bereitete Mischung 5%iger Nitroprussidnatriumlösung mit einer 20%igen Lösung von Morpholin in Wasser.

Arbeitsweise: In einer Mikroeprouvette wird ein Tropfen der wäßrigen Lösung mit einem Tropfen einer frisch bereiteten Natriumhypobromitlösung vereinigt und in einem siedenden Wasserbad erwärmt. Auf das offene Ende der Eprouvette wird ein Scheibchen Filtrierpapier gelegt, das mit einem Tropfen des oben angegebenen Nitroprussidnatriumreagens befeuchtet wurde. Je nach der Menge α-Alanin entsteht nahezu sofort oder innerhalb 1 bis 3 Minuten ein mehr oder weniger intensiv blauer Fleck.

Erfassungsgrenze: 15 μg α-Alanin.

VI. Nachweis von Chloranil
(Unterscheidung von Bromanil)

Chloranil (Tetrachlorbenzochinon) wird als starkes, in organischen Lösungsmitteln wirksames Oxydans viel verwendet. Sein Nachweis ist nicht nur aus diesem Grunde, sondern auch deshalb von Interesse, weil die Vorprobe auf Aromatica nach *Colmant*[19] davon Gebrauch macht, daß Chloranil beim Erwärmen zahlreicher aromatischer Verbindungen mit Kaliumchlorat und konz. Salzsäure entsteht[20]. Für Zwecke der Tüpfelanalyse ist ein empfindliches und selektives Verfahren empfohlen worden[21]; dieses beruht auf dem eigenartigen Effekt, daß verdünnte Lösungen von Chloranil in Äther, Benzol usw. auf Zusatz von Tetrabase

(Tetramethyl-p-diamino-diphenylmethan) unverändert bleiben und erst nach Verdampfen des Lösungsmittels die erwartete Bildung des blauen chinoiden Oxydationsproduktes der Tetrabase[22] erfolgt. Da die blaue Verbindung bei Verreiben von trockenem Chloranil und Tetrabase sofort entsteht, wurde angenommen, daß die Reaktionslosigkeit in Äther, Benzol usw. auf dem Vorliegen stabiler Solvate der Komponenten beruht. Diese „Maskierung durch Solvatbildung" wird durch Verdampfen des Lösungsmittels aufgehoben, wodurch Chloranil und Tetrabase in so innigem Kontakt hinterbleiben, daß die Redoxreaktion als Festkörperreaktion bei Zimmertemperatur (schneller bei gelindem Erwärmen) eintreten kann. Von der Annahme, daß in der farblosen Lösung das Solvat einer Additionsverbindung von Chloranil und Tetrabase vorliegen könne, wurde deshalb abgesehen, weil alle bisher bekannten Molekülverbindungen des Chloranils intensiv farbig sind (vgl. VII). Bei Zutreffen einer Maskierung durch Solvatbildung war zu erwarten, daß auch bei Solvaten von farbigen Molekülverbindungen des Chloranils nach Abdampfen des Lösungsmittels innermolekulare Reaktionen dazu befähigter Bestandteile der Molekülverbindung eintreten können. Wir glauben, ein diesbezügliches Beispiel bei einer lange bekannten Farbreaktion des Chloranils gefunden zu haben: *Ciusa*[23] hat beobachtet, daß die ätherische Lösung von Chloranil auf Zusatz von Pyrrol eine weinrote Farbe annimmt; in analoger Weise verhält sich Bromanil. Diese Farbreaktionen sind zu unempfindlich, als daß sie zum Nachweis von Chloranil oder Bromanil herangezogen werden könnten. Bringt man jedoch von den farbigen Lösungen einen Tropfen auf Filterpapier, so hinterbleibt nach Verdunsten des Lösungsmittels bei Vorliegen von Chloranil ein blauer Fleck, während bei Bromanil der zunächst rote Tüpfelfleck farblos wird. Chloranillösungen, die so verdünnt sind, daß sie auf Zusatz von Pyrrol keine Orangefärbung zeigen, hinterlassen nach Verdunstung auf Filterpapier einen intensiv blauen Fleck. Auf diese Weise kann Chloranil auch neben Bromanil empfindlich nachgewiesen werden. Für die Lösung dieser Aufgabe war bisher kein Verfahren bekannt.

Der Chemismus der Farbreaktion in Lösung und nach Verdunsten des Lösungsmittels ist noch nicht bekannt. Naheliegend erscheint folgende Erklärung: Die Orangefärbungen beruhen auf der Bildung in Äther, Benzol usw. löslicher Additionsverbindungen. Von diesen ist die Bromanilverbindung nach Verdunsten des Lösungsmittels unbeständig und zerfällt in ihre Komponenten, während die Chloranilverbindung nach Abdampfen des Lösungsmittels ein blaues Kondensationsprodukt des Chloranils mit Pyrrol (in der Pyrrolen-Form) bildet. Für diese Auffassung spricht, daß der blaue Tüpfelfleck, der nach Verdunsten der Chloranil-Pyrrolmischung auf Filterpapier verbleibt, bei Antüpfeln mit Äther usw. nicht mit orangeroter Farbe weggelöst wird, sondern verändert bleibt.

Arbeitsweise: Auf Filterpapier wird auf eine mit Bleistift vermerkte Stelle ein Tropfen der ätherischen oder benzolischen Probelösung gebracht und das Lösungsmittel verdunsten gelassen. Hierauf wird mit einem Tropfen einer frisch bereiteten benzolischen oder ätherischen Pyrrollösung angetüpfelt. Je nach der Menge an Chloranil hinterbleibt nach Trocknen ein mehr oder weniger intensiv blauer Fleck, umgeben von einem blauen Kreis.

Erfassungsgrenze: 2 μg Chloranil.

Man kann auch auf ein Scheibchen Filterpapier einen Tropfen der benzolischen oder ätherischen Probelösung bringen und nach Verdunsten des Lösungsmittels mit Pyrroldämpfen räuchern (Auflage des Papierscheibchens auf einen Mikrotiegel, in dem 1 bis 2 Tropfen Pyrrol mit einem Mikroflämmchen erwärmt werden). Dieses Verfahren ist etwa 6 bis 8 mal weniger empfindlich als unmittelbares Antüpfeln, hat jedoch den Vorteil, daß auch unreines Pyrrol verwendet werden kann, dessen ätherische oder benzolische Lösungen braun sind.

VII. Nachweis von Naphthalin

Die farblosen aromatischen Kohlenwasserstoffe mit kondensierten Benzolringen wie Naphthalin, Acenaphthen, Anthracen, Phenanthren, Perylen usw., sowie die Benzolderivate Duren, Fluoren, Stilben usw. bilden mit dem hellgelben Chloranil farbige Additionsverbindungen im Molverhältnis 1:1 oder 1:2. Diese Verbindungen entstehen in konzentrierten Lösungen der Komponenten in Benzol, Chloroform usw., in Schmelzen der Kohlenwasserstoffe, sowie bei Sinterung unterhalb der Schmelzpunkte der Komponenten infolge von Festkörperreaktionen[24].

Die ziegelrote Additionsverbindung des Chloranils mit Naphthalin entsteht bereits bei Kontakt des Dampfes dieses Kohlenwasserstoffs mit festem Chloranil (Fp = 290°C). Naphthalin, das bei 80°C schmilzt und oberhalb dieser Temperatur sublimiert, hat bereits bei 50 bis 70°C einen so erheblichen Dampfdruck, daß die Farbreaktion mit Chloranil im Gasraum über dem noch festen Kohlenwasserstoff eintritt. Unter diesen Bedingungen ist die Farbreaktion für Naphthalin weitgehend selektiv, da mit Ausnahme von Methyl- und Äthylnaphthalin keiner der oben zitierten Kohlenwasserstoffe reagiert. Bei Anwendung des nachstehend beschriebenen Nachweises ist allerdings zu beachten, daß sublimierbare Phenole und Amine gleichfalls mit Chloranil farbige Reaktionsprodukte liefern.

Arbeitsweise: In die Hülse des in der Tüpfelanalyse viel verwendeten Gasadsorptionsapparates[25] wird eine kleine Menge der festen Probe gebracht oder ein Tropfen der ätherischen Lösung verdampt. Auf den Knopf des Verschlußstückes wird ein Tropfen einer gesättigten Lösung von Chloranil in Petroläther oder Benzol gebracht, das Lösungsmittel durch Verdampfen entfernt und der verschlossene Apparat in auf zirka 40° erwärmtes Wasser getaucht. Man steigert die Temperatur auf 50 bis 60°. Bei Anwesenheit von

Naphthalin nimmt je nach dessen Menge der hellgelbe Belag am Knopf des Verschlußstückes eine mehr oder weniger intensiv ziegelrote Farbe an.

Erfassungsgrenze: 25 μg Naphthalin.

Der hier beschriebene Nachweis von Naphthalin ist ein gutes Beispiel für die analytische Verwertung der Bildung farbiger organischer Molekülverbindungen, die häufig durch schnell verlaufende Additionsreaktionen aus ihren Komponenten entstehen. Farbreaktionen, die auf der Bildung von Molekülverbindungen beruhen, verdienen in der Tüpfelanalyse Beachtung, wie empfindliche Nachweise von Anthracen und Nitroverbindungen mit Pikrinsäure bzw. Tetrabase oder Diphenylamin zeigen, auf die hier hingewiesen sei[26].

Wir danken an dieser Stelle dem Conselho Nacional de Pesquisas für die Förderung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Zusammenfassung

Ausgehend von Überlegungen und Erfahrungen der Chemie der spezifischen, selektiven und empfindlichen Reaktionen wurden ausgearbeitet:

1. Nachweis von Anthrachinon-Sulfosäuren, beruhend auf der Synthese von Polyhydroxyanthrachinonen.

2. Nachweis sekundärer Alkohole, beruhend auf Redoxreaktionen mit geschmolzenem Schwefel.

3. Nachweis von Bernsteinsäure und Succinimid, beruhend auf der Bildung von Pyrrol durch Zinkstaubdestillation in Gegenwart von Ammoniumchlorid.

4. Nachweis von 1,2-Diketonen, beruhend auf der Benzilsäure-Umlagerung.

5. Nachweis von α-Alanin (Unterscheidung von β-Alanin), beruhend auf der Bildung von Acetaldehyd.

6. Nachweis von Chloranil (Unterscheidung von Bromanil), beruhend auf dem Verhalten zu Pyrrol.

7. Nachweis von Naphthalin, beruhend auf der Bildung einer farbigen Additionsverbindung mit Chloranil.

Sämtliche Nachweise sind in der Arbeitsweise der Tüpfelanalyse ausführbar, wobei mikroanalytische Erfassungsgrenzen erreicht werden.

Summary

Persuant to considerations and experiences derived from the chemistry of specific, selective and sensitive reactions, methods were developed for:

1. Detection of anthraquinone-sulfonic acids, based on the synthesis of polyhydroxyanthraquinones.

2. Detection of secondary alcohols, based on redox reactions with fused sulphur.

3. Detection of succinic acid and succinimide, based on the formation of pyrrole by distillation with zinc dust in the presence of ammonium chloride.

4. Detection of 1,2-diketones, based on the benzilic acid rearrangement.

5. Detection of α-alanine (differentiation from β-alanine), based on the formation of acetaldehyde.

6. Detection of chloranil (differentiation from bromanil), based on the behavior toward pyrrole.

7. Detection of naphtalene, based of the formation of a colored addition compound with chloranil.

All of the tests can be accomplished within the technique of spot test analysis, and microanalytical limits of detection are then attainable.

Résumé

Sur la base de considérations et de résultats expérimentaux du domaine de la chimie des réactions spécifiques, sélectives et sensibles, les auteurs ont élaboré les techniques d'identification suivantes:

1° Identification d'acides anthraquinonesulfoniques reposant sur la synthèse de polyhydroxyanthraquinones.

2° Identification de groupements alcools secondaires reposant sur des réactions d'oxydoréduction avec le soufre fondu.

3° Identification de l'acide succinique et de la succinimide reposant sur la formation de pyrrole par réduction par la poudre de zinc et distillation en présence de chlorure d'ammonium.

4° Identification de dicétones 1,2 reposant sur la «transposition benzilique».

5° Identification de l'α alanine (différenciation de la β alanine) reposant sur la formation d'acétaldéhyde.

6° Identification du chloranile (différentiation du bromanile) reposant sur son comportement en présence de pyrrole.

7° Identification du naphtalène reposant sur la formation d'un composé d'addition coloré avec le chloranile.

Toutes ces identifications peuvent être effectuées par la technique des réactions à la touche, ce qui permet d'atteindre les limites de détection microanalytiques.

Literatur

[1] *H. Lieb* und *W. Schöniger*, Anleitung zur Darstellung organischer Präparate mit kleinen Substanzmengen. Wien: Springer-Verlag. 1950.

[2] *F. Feigl*, Spot Tests in Organic Analysis. 5th edition. Amsterdam: Elsevier. 1956.

[3] *F. Feigl*, Chemistry of Specific, Selective and Sensitive Reactions New York: Academic Press. 1949.

[4] *F. Feigl*, loc. cit. 2, Kap. 1.

[5] *F. Feigl* und *C. Stark*, Analyt. Chemistry **27**, 1838 (1955).

[6] *Ch. A. Bell*, Ber. dtsch. chem. Ges. **13**, 817 (1880).

[7] *H. Fischer* und *F. Meyer-Betz*, Z. physiol. Chem. **75**, 232 (1911); vgl. *E. Salkowsky*, Biochem. Z. **103**, 185 (1920).

[8] *L. Rosenthaler*, Pharm. Ztg. 91—100, 475 (1955).

[9] *M. Ishidate*, Mikrochim. Acta **3**, 283 (1938).

[10] Vgl. *F. Feigl*, loc. cit. 2, Kap. 4.

[11] *J. Liebig*, Ann. Chem. **25**, 27 (1858).

[12] Vgl. *F. C. Whitmore*, Organic Chemistry, New York. S. 438, 563, 717 (1951).

[13] *F. Feigl*, loc. cit. **2**, S. 120, 461.

[14] Vgl. *R. B. Wagner* and *H. D. Zook*, Synthetic Organic Chemistry. New York. 1953. S. 153.

[15] *O. Frehden* und *L. Goldschmiedt*, Mikrochim. Acta. **2**, 186 (1937).

[16] *H. Schiff*, Ann. Chem. **140**, 93 (1866); vgl. *H. Wieland* und *G. Scheuing*, Ber. dtsch. chem. Ges. **54**, 2527 (1921).

[17] *L. Lewin*, Ber. dtsch. chem. Ges. **32**, 3388 (1899).

[18] *F. Feigl* und *V. Anger*, Mikrochim. Acta **1**, 138 (1937).

[19] *E. R. L. Pr. Colmant*, Chem. Zbl. **1931**, I 3705.

[20] Vgl. *L. Denis*, Bull. soc. chim. Belgique **35**, 375 (1926).

[21] *F. Feigl*, *V. Gentil* und *J. E. R. Marins*, Analyt. Chim. Acta **13**, 210 (1955).

[22] Vgl. *W. Prodinger*, Mikrochem. **36/37**, 580 (1951).

[23] *R. Ciusa*, Gazz. chim. ital. **41**, 666 (1907).

[24] *H. Haakh*, Ber. dtsch. chem. Ges. **42**, 4599 (1909).

[25] *F. Feigl*, loc. cit. **2**, S. 49; vgl. auch *P. Reckendorfer*, Mikrochim. Acta, [Wien] **1955**, 1008.

[26] *F. Feigl*, loc. cit. **2**, S. 160, 327.

Chemistry Department, The Queen's University of Belfast, Northern Ireland

The Reduction and Determination of Small Amounts of Rhenium-VII*

By

Hans Spitzy, Robert J. Magee and **Cecil L. Wilson**

With 2 Figures

(Received February 1, 1957)

In connection with some work on technetium, the authors found it necessary to develop a method for the determination of small amounts of rhenium. The most direct method appeared to be a reduction of perrhenate to the 5-valent state, followed by quantitative oxidation back to the higher valency using a suitable oxidising agent. The reduction of rhenium from the 7- to the 5-valent state is a recognised step[1]. Publications dealing with the method of reduction are not numerous, however, and those that do exist[2–5] are somewhat confusing.

According to *Tribalat*[2], rhenium-VII can be quantitatively reduced to rhenium-V by means of stannous chloride in 4 *N* hydrochloric acid solution, the rhenium-V existing as an unstable emerald-green solution which can be stabilised by oxalic acid.

Maun and *Davidson*[4] also reported investigations on the reduction of perrhenate with stannous chloride in 4 *N* hydrochloric acid. They state that the resultant solution is light green in colour, and is stable for some hours. The absorption spectrum of this solution shows two minima at 560 mμ and 890 mμ, and a maximum at 760 mμ.

Recently *Lazarev*[5], reporting investigations on the reduction of rhenium-VII by means of liquid amalgams of zinc, cadmium, lead and bismuth, in the presence of hydrochloric or sulphuric acid, claimed the most suitable quantitative reductant to be bismuth amalgam in 18 *N* sulphuric acid. In the abstract of this paper it is stated that "after 8 minutes the reduction is independent of time". Since the original paper was not available for consultation, it is not possible to be certain of the precise meaning of this statement.

* To Professor Dr. *Hans Lieb*, University of Graz, for his 70th birthday.

Before attempting to perfect a method for the determination it seemed desirable to carry out a complete experimental investigation. This paper presents the results of the investigation, and outlines a method for the determination of small amounts of the element.

Reduction of Perrhenate with Stannous Chloride

Attempts were made to reduce perrhenate with a 0.01 *M* solution of stannous chloride in 4 *N* hydrochloric acid, and then to oxidise the reduced solution with standard ceric sulphate solution, the oxidation being followed potentiometrically. Quantitative results could not be achieved, because excess stannous chloride was necessary to bring about complete reduction of the perrhenate, and this excess, together with evolved chlorine, interfered with the determination.

A number of other reductants were tried. Of these, ascorbic acid, hydroxylamine hydrochloride and hydrazine apparently had no reducing effect, and sodium amalgam was too powerful, probably producing a mixture of rhenium-V and rhenium-IV, perhaps together with lower valent states.

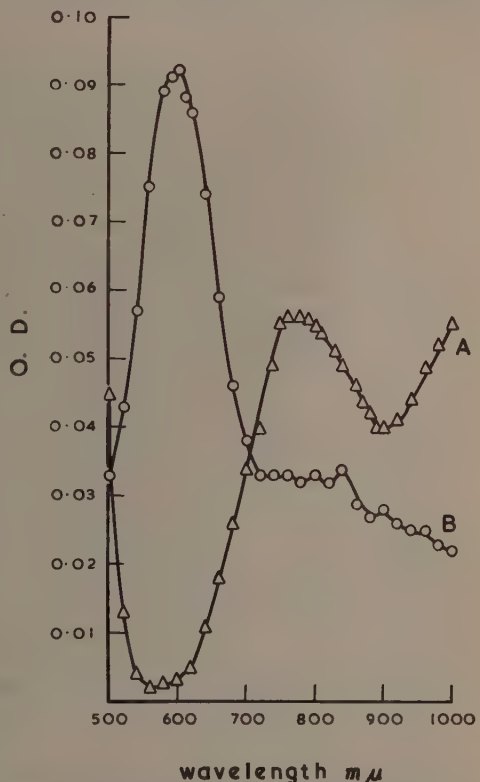


Fig. 1. Absorption spectra of Re^{V} in 18 *N* sulfuric acid (*B*) and the Re^{V}-complex with hydrochloric acid (*A*)

The investigation confirmed the statement of *Tribalat*[2] that the reduced solution is unstable. The reduced form, originally yellow-green or yellow. changes in a few hours through yellow-brown to brown. The brown colour slowly increases in intensity because of the production of a fine precipitate which is considered to be ReO_2. Solutions of perrhenate which had been freshly reduced by *Tribalat*'s method to the lower valent form were found to have an absorption spectrum (Fig. 1, *A*)

corresponding precisely to that reported by *Maun* and *Davidson*. Further more, reductions carried out by the same method, either in the presence of oxalic acid, or followed by the addition of oxalic acid after the appearance of the yellow-green colour, showed the same absorption. The presence of the oxalic acid did, however, undoubtedly stabilise the reduced form, since over a period of at least 21 hours no change in colour was observed.

Information confirmed or gained from these investigations may be summarised as follows:

(a) Rhenium-V produced by reduction with stannous chloride in 4 *N* hydrochloric acid is unstable.

(b) Oxalic acid stabilises the 5-valent state, but the absorption spectrum supports the view that this does not arise from complex formation.

(c) The method does not provide a satisfactory basis for the determination of rhenium.

Reduction of Perrhenate with Bismuth Amalgam

Reductions were carried out with bismuth amalgam prepared according to the method of *Brauer*[6]. Using vigorous shaking, 20.00 ml of 0.0005 *M* perrhenate in 18 *N* sulphuric acid were reduced with 2 ml of bismuth amalgam in a separatory funnel (12 cm · 2 cm). The colour of the solution which resulted was blue, and this was stable for at least 1 hour. The solution was titrated with 0.01 *N* ceric sulphate (in 18 *N* sulphuric acid) using *o*-phenanthroline-ferrous sulphate as indicator. Equivalent amounts of ceric sulphate required to oxidise the reduced solution after various times of reduction are reproduced in Fig. 2. It is evident from this curve that under the conditions of the experiment, where the period of reduction lies between 6 and 12 minutes 2 equivalents of ceric sulphate are required for oxidation. It may be assumed, therefore, that on reduction under these conditions the rhenium exists in the solution as rhenium-V. When the period of reduction exceeds 12 minutes more than 2 equivalents are required for oxidation, and the over-reduced solution shows formation of the fine brown precipitate assumed to be ReO_2. Further, there is no evidence which can be interpreted as indicating a transition through 6-valent rhenium, because, as can be seen from Fig. 2, even after 15 seconds shaking with the amalgam 1.58 equivalents of ceric sulphate are required for the oxidation.

Factors which influence the production of this reduced form of rhenium were found to be as follows:

(a) The rate and time of shaking. Under the conditions described shaking must be vigorous.

(b) The relation of the volume of the bismuth amalgam to that of the rhenium-containing solution. As a consequence, this ratio must be carefully

controlled in any method designed to give a quantitative reduction of rhenium-VII to rhenium-V.

(c) Temperature. Reduction at 95° C took place much more rapidly.

(d) The strength of the sulphuric acid. Dilution of the blue reduced solution with water causes the colour to change almost immediately to yellow, with gradual deposition of a brown precipitate.

Before applying the method of reduction to the determination of rhenium, several other points were investigated. Extensive experiments showed that it is not necessary to work in an atmosphere of carbon dioxide, as has been done by previous investigators. In fact, resistance of the system to atmospheric oxidation is remarkably high. Even if oxygen is bubbled through the solution for 15 minutes, a negative error of only 11% is produced.

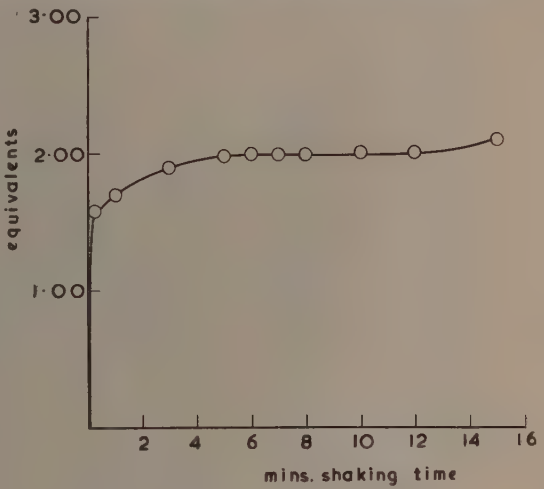


Fig. 2. Dependence of titre on time of shaking

Reductions were carried out in the presence of oxalic acid; in addition, simple reductions were carried out and oxalic acid was subsequently added. In each case stable blue solutions were obtained, but the absorption spectrum was always identical with that obtained by reduction in the absence of oxalic acid (Fig. 1, *B*). It will be observed, however, that the absorption spectrum of the blue rhenium-V solution produced by this method is completely different from that of the solution of *Tribalat* or of *Maun* and *Davidson*. When an equal volume of concentrated hydrochloric acid is added to the blue solution obtained from reduction by bismuth amalgam in 18 *N* sulphuric acid (the final concentration of the hydrochloric acid being then about 6 *N*) the blue solution changes to a yellow solution showing the absorption spectrum quoted by *Maun* and *Davidson*, and found in these investigations to be characteristic of the yellow-green form (Fig. 1, *A*). This lends some support to the view of *Lazarev* that the rhenium-V in the latter exists in the form of some sort of hydrochloric acid complex. The curve shown in Fig. 1, *B*, might then be assumed to represent the spectrum of the uncomplexed rhenium-V.

In titrating the reduced solution with ceric sulphate, oxidation is slow at and near the end-point. To improve the titration the procedure was amended. An excess of ferric sulphate in 18 *N* sulphuric acid was added to the reduced solution, and the ferrous sulphate produced was then titrated with ceric sulphate in the normal way[7]. The end-point was then speedily and easily determinable.

Determination of Rhenium

Reagents: 0.01 *M* potassium perrhenate (prepared from "specpure" potassium perrhenate, Johnson Matthey and Co., Ltd., London); 0.01 *N* ceric sulphate; ferric sulphate; *o*-phenanthroline-ferrous sulphate indicator; *N*-phenylanthranilic acid indicator.

Table 1

mg Re given	mg Re found	$\pm \Delta t$, mg
1.86	1.88	+ 0.02
3.72	3.71	— 0.01
2.80	2.82	+ 0.02
0.18	0.17_6	0
2.60	2.60	0
2.87	2.88	+ 0.01
1.43	1.40	— 0.03
0.93	0.92	— 0.01
0.19	0.17	— 0.02
0.04	0.03	— 0.01
0.93	0.93	0

All reagents except the indicators were made up in 18 *N* sulphuric acid, and apart from the perrhenate, all reagents were of Analar grade.

Procedure: To 20 ml of the rhenium-containing solution in a separatory funnel (12 cm · 2 cm) add 2 ml of bismuth amalgam and shake vigorously for 7 minutes. Allow to settle, and draw off the amalgam. To the solution add excess of ferric sulphate solution followed by 0.05 ml of *o*-phenanthroline indicator solution. Titrate with 0.01 *N* ceric sulphate solution added from a microburette graduated to 0.01 ml. Carry out a blank determination under the same conditions, and correct for the blank value.

1 ml 0.01 *N* ceric sulphate $\equiv$ 931.5 μg Re.

Results: Values obtained in a number of experiments are shown in Table 1.

Samples 9–11 were supplied to one of us (H. S.) as "unknowns". It is thus possible to determine amounts from 0.1 mg to 10 mg by this method with the accuracy shown.

Determination of Microgram Amounts of Rhenium

An "Agla" micrometer syringe (Messrs. Burroughs Wellcome and Co., London) was adapted for use as a microburette for the titration of microgram amounts of rhenium. In the reduction the conditions and quantities described above were first maintained. At the end of the reduction the

volume was made up to 100 ml with 18 N sulphuric acid, and aliquots were titrated. Delivery of titrant from the "Agla" burette could be controlled with certainty to 0.0002 ml.

The ceric sulphate used as titrant was 0.02 N, and N-phenylanthranilic acid was found to be preferable as indicator since it gave a more pronounced colour change. Stirring of the solution was effected by a stream of bubbles of carbon dioxide. The titration figure obtained was corrected by a blank which, in these experiments, was 1.6 μl of ceric sulphate solution.

1 μl 0.02 N ceric sulphate $\equiv$ 1.8 μg Re.

Table 2

μg Re given	μg Re found	$\pm \Delta f$, μg
75	73	— 2
75	75	0
75	75	0
45	43	— 2
15	17	+ 2
30	31	+ 1
15	17	+ 2
60	62	+ 2
82	84	+ 2
19	20	+ 1

In one series of experiments 1.49 mg of rhenium were reduced as described. Excess ferric sulphate solution was added and the mixture was diluted to 100 ml with 18 N sulphuric acid. Using varying aliquots of this solution the results shown in Table 2 were obtained. Samples 6–10 were supplied as "unknowns".

Taking the process a stage further, it was also found possible to carry out the reduction on a small scale, using a small bottle of capacity 1.2 ml with a ground-glass stopper. In the bottle 0.5 ml of perrhenate solution and 0.3 ml of bismuth amalgam were shaken vigorously for 3 minutes. The reduced solution was then drawn off and the flask and amalgam were washed 3 times with 18 N sulphuric acid. The total volume of solution and washings was adjusted to 3 ml and the titration was then carried out as described. The results of some determinations carried out by this procedure are shown in Table 3.

Table 3

μg Re given	μg Re found
56	56
74	67
93	91
93	90

One of us (H. S.) would like to take this opportunity to thank the Department of Chemistry of the Queen's University of Belfast for the facilities granted in carrying out this work.

Summary

Investigations on the reduction of rhenium-VII to rhenium-V have been carried out. The use of stannous chloride in hydrochloric acid solution was not found suitable as the basis for the quantitative determination of the element. The most satisfactory reductant was found to

be bismuth amalgam in 18 *N* sulphuric acid. A method is outlined for the determination of milligram amounts of rhenium ranging from 0.1 to 10 mg with a standard deviation of $\pm$ 0.02 mg, using this as a basis. The procedure, with only slight modification, can be extended to the determination of microgram amounts of the element.

Measurement of absorption spectra indicates that in hydrochloric acid solution a complex is formed between the acid and rhenium-V, but that the stabilisation of rhenium-V by oxalic acid does not arise from the formation of a complex.

Zusammenfassung

Untersuchungen über die Reduktion von Rhenium(VII) zu Rhenium(V) wurden durchgeführt. Zinn(II)-chlorid in salzsaurer Lösung bewährt sich für die quantitative Bestimmung des Rheniums nicht. Als bestes Reduktionsmittel erwies sich Wismutamalgam in 18-n Schwefelsäure. Auf dieser Basis wurde ein Verfahren zur Milligrammbestimmung von Rhenium ausgearbeitet, das im Bereich zwischen 0,1 und 10 mg Abweichungen von $\pm$ 0,02 mg zeigt. Mit nur geringen Abänderungen läßt es sich auch zur Bestimmung von Mikrogrammengen verwenden.

Messungen der Absorptionsspektren ergaben, daß sich in salzsaurer Lösung ein Komplex aus Säure und Rhenium(V) bildet, daß aber die Stabilisierung des 5wertigen Rheniums durch Oxalsäure nicht auf der Bildung eines Komplexes beruht.

Résumé

Recherches sur la réduction du rhénium VII en rhénium V. On a établi que la solution de chlorure stanneux dans l'acide chlorhydrique n'est pas un réactif approprié à la détermination quantitative de l'élément. On a montré que le réducteur le plus satisfaisant était l'amalgame de bismuth dans l'acide sulfurique 18 N. Les auteurs esquissent une méthode basée sur l'emploi de ce réactif pour le microdosage du rhénium en quantités variant de 0,1 à 10 mg avec un écart type de $\pm$ 0,02 mg. La technique légèrement modifiée peut être étendue au dosage de quantités de l'ordre de grandeur du microgramme.

Les mesures de spectres d'absorption montrent qu'en solution d'acide chlorhydrique il se forme un complexe entre l'acide et le rhénium V mais que par contre la stabilisation du rhénium V par l'acide oxalique ne résulte pas de la formation d'un complexe.

References

[1] *W. M. Latimer*, The Oxidation States of the Elements and Their Potentials in Aqueous Solutions, 2nd ed. New York: Prentice-Hall, 1952, p. 244.

[2] *S. Tribalat*, C. r. acad. sci., Paris **220**, 881 (1945); **222**, 1388 (1946).

[3] *J. G. F. Druce*, "Rhenium", Cambridge University Press, 1948.

[4] *E. K. Maun* and *N. Davidson*, J. Amer. Chem. Soc. **72**, 2254, 3509 (1950).

[5] *A. I. Lazarev*, Zhur. Neorg. Khim. **1**, 385 (1956); Chem. Abstr. **50**, 12718 (1956).

[6] *G. Brauer*, Handbuch der präparativen anorganischen Chemie. Stuttgart: F. Enke, 1954, p. 1395.

[7] *W. Geilmann* and *F. W. Wrigge*, Z. anorg. Chem. **222**, 56 (1935).

From the Microchemical Group, Stamford Research Laboratories, Research Division, American Cyanamid Company, Stamford, Connecticut, U. S. A.

Automatic Ignition of the Sample vs. Use of the Bunsen Burner in the Rapid Silver Absorbent Method for Sulfur*

By

J. A. Kuck and Elizabeth C. Grim

With 1 Figure

(Received November 20, 1956)

Microanalysts often fail to appreciate the concept of "cumulative error" as it applies to their routine work. Yet this principle operates everywhere and plays a part in even the simplest experimental procedure. It might be summarized by saying that whenever an additional variable, no matter how slight, can be eliminated from a quantitative procedure, the total quantity of error is correspondingly reduced. The gain in accuracy resulting from the change may be inconspicuous upon mere visual inspection of the analytical figures, but a careful study of the data will disclose the improvement.

This paper deals with an interesting example of this phenomenon in connection with the "rapid" determination of sulfur previously reported by us[1]. Making a seemingly insignificant change in operating procedure was found to reduce the total error of the method by eliminating some obscure source of error associated with previous practice. A simple statistical analysis[2] revealed the unrecognized improvement in precision.

Background of the Experiment

In our first work with the silver absorbent, we ignited the sample in its capsule by means of a Bunsen burner held in the hand. At the end of the ignition period, the first electric furnace *A* (see *Kuck* and *Grim*[1], Fig. 1) was drawn forward over the combustion tube and allowed to remain for 35 minutes in order to insure combustion of any unburned traces of sample.

* To Prof. Dr. *Hans Lieb* at his 70th birthday.

Recently a new automatic electric furnace became available to us for use in the "rapid" sulfur determination. This equipment is a combustion apparatus of the "static directional gradient program" type with a triple-section sample burner (Fig. 1).

It was desirable to substitute ignition with the triple-section sample burner for the hand burner in our original sulfur procedure. It was

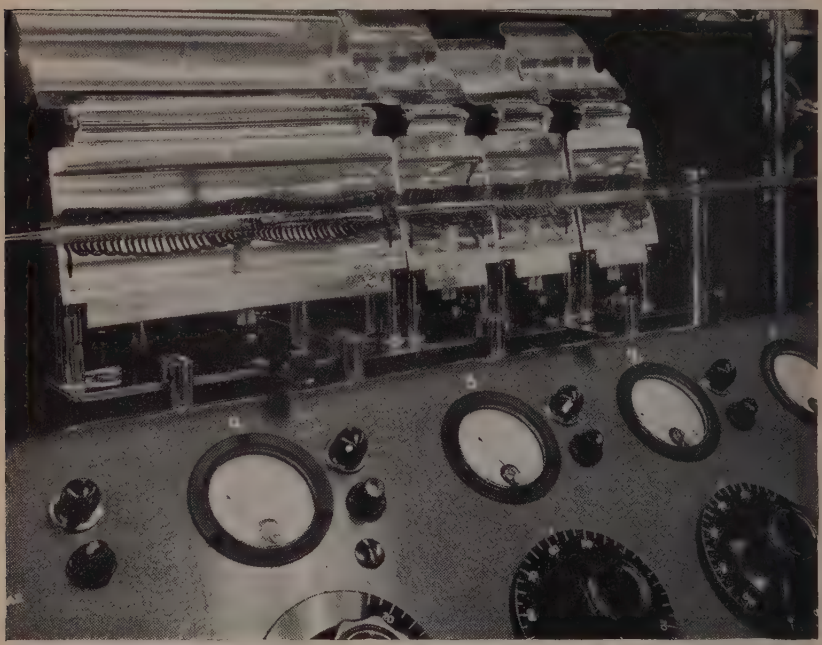


Fig. 1. Sargent Automatic Electric Microcombustion Furnace*

therefore important to see if we could take advantage of the automatic feature in this new furnace. Then, if such substitution could be made, would the elimination of the variable involved in the operation of burning samples by hand show up as an improvement in precision and accuracy? Information gained from this study might also throw some light on the frequently debated subject of the general merits of automatic combustion equipment.

It was therefore proposed to analyze a few substances by each modification of combustion procedure to determine if there would be any

* E. H. Sargent & Co., 4647 West Forster Avenue, Chicago 30, Illinois; Automatic Micro and Semimicro Radiant Furnace with Static Triple Section Burner; No. S-21570.

improvement in the analytical data. A series of five sulfur determinations was made on each of four standard test samples with automatic ignition. The results were then compared with ten analyses of each substance previously carried out with the Bunsen burner. The compounds employed were National Bureau of Standards cystine, sulfathiazole, sulfanilamide, and 5-hydroxyethyl-6-methyl-2-thiouracil.

Although the operating procedure for the silver absorbent method for S has already been reported[1], a few changes relating to the application of the new automatic unit to the determination must be mentioned.

Furnaces No. 1 and 2 (in Fig. 1 over the quartz capsule) function in the sample ignition. They are switched on and off at proper times by the operator, although the wiring system of the unit can be easily changed to do this automatically. The quartz capsule containing the sample is placed in the combustion tube so that it extends through furnace No. 1 and about 10 mm into furnace No. 2. Furnace No. 3 (continuously hot) surrounds the first platinum contact star. Furnace No. 4 (also continuously hot) surrounds the second platinum star as well as the silver gauze roll resting near the exit end of the combustion tube. (The distant end of the gauze coincides with the edge of the furnace.) Furnaces No. 1 and 2 are set at 950°; No. 3 at 900°; and No. 4 at 650°. These temperatures are measured by chromel-alumel thermocouples located under the mid-point of each heating element.

In the combustion procedure the narrow platinum boat (with 2 to 3 mg sample) is inserted in the capsule and the latter located in the combustion tube as illustrated in Fig. 1[1]. The cleaned silver gauze is then placed at the other end. Purified O_2 is passed through at a rate of 55–58 ml/min for 5 minutes with furnaces No. 3 and 4 at their established temperatures. Furnace No. 2 is turned on at the 5th minute; No. 1 at the 11th minute; and both are turned off at the 35th minute. The gauze roll is removed for cooling at the 45th minute and weighed at the 60th minute; the increase being the weight of (SO_4^{2-}).

Discussion of Results

Table I gives the means and standard deviations of results of analyses of the four test samples by the two methods of ignition. Although the results are good by either procedure, those obtained with automatic combustion are consistently closer to theory and have smaller standard deviations. On the other hand, their apparent superiority in accuracy and precision is so slight that any claim of superiority is doubtful. It could be argued that the small differences in the results of the two methods of operation are purely accidental and that combustion by hand might make a better showing next time in a repetition of the comparative study.

The question is resolved by computing the variances for the two methods of ignition and comparing them in the statistical F-test. For convenience in computation, variances based on individual deviations from theory are used instead of deviations from the means. This procedure is based on the philosophy that the standard test compounds employed represent standards of absolute purity and have theoretical composition; deviations from the mean are more appropriate to situations where the purity of the test compounds has not been established and where the true sulfur content may not be the theoretical one. In the present study we assume that our test compounds are absolutely pure for all practical

Table I. Mean and Standard Deviation of Sulfur Determinations by Two Methods of Ignition

	Compound	% S Theory	5 Analyses Automatic Furnace		10 Analyses Bunsen Flame	
			Mean	σ	Mean	σ
A	Cystine	26.68	26.57	0.07	26.55	0.11
B	Sulfathiazole	25.11	25.09	0.07	25.00	0.10
C	Sulfanilamide	18.62	18.55	0.08	18.54	0.16
D	5-Hydroxyethyl-6-methyl-2-thiouracil	17.22	17.14	0.12	17.12	0.16

purposes. Since the standard deviations happen to be about the same by either calculation, however, we can work with either the variability of the analytical results for each compound referred to theory or the variability of the results around their respective means. This situation exists because the results of both methods are close to theory and highly precise.

Bunsen Flame

$$\frac{\Sigma \text{ squares of deviates} - \dfrac{(\Sigma \text{ deviates})^2}{\text{No. of analyses}}}{\text{No. of analyses} - 1} = \frac{1.0116 - (3.12)^2/40}{39} =$$

$$= 0.01969846 = s_1^2.$$

Automatic Furnace

$$\frac{\Sigma \text{ squares of deviates} - \dfrac{(\Sigma \text{ deviates})^2}{\text{No. of analyses}}}{\text{No. of analyses} - 1} = \frac{0.1853 - (1.09)^2/20}{19} =$$

$$= 0.00662605 = s_2^2.$$

$s_1^2/s_2^2 = 2.97$ for 39/19 degrees of freedom. $F(1\%) = 2.76$.

For the actual statistical F-test itself, variances representing pooled data for each method were used. This was necessary in order to have

sufficient working data to detect the subtle difference between the two methods. The computation is shown in Table II. On the assumption that automatic ignition would give better precision, the F-ratio was set up with variance-by-automatic-ignition in the denominator. Then

Table II. Comparison of Variances Representing Pooled Data from Each Method of Sample Ignition

Compound	A	B	C	D	Total	Mean
Bunsen Flame						
Σ deviates	1.32	1.06	0.77	— 0.03	3.12	
Mean of deviates	0.132	0.106	0.077	— 0.003		0.078
Automatic Furnace						
Σ deviates	0.56	0.12	0.33	0.08	1.09	
Mean of deviates	0.112	0.024	0.066	0.016		0.0545

if the calculated F-ratio is greater than the F-value in the table, this assumption is true and there is a significant difference in precision between the two techniques. The F-ratio 0.01969846/0.00662605 proves to be 2.97 for 39 and 19 degrees of freedom. Since this exceeds the F-value of 2.76 in the table[3] (99% confidence), the variances were found to differ significantly, and consequently the method of automatic ignition can be said to give better precision.

Table III. Comparison of Means of Pooled Data from Each Method of Sample Ignition

$$t = \frac{0.078 - 0.054}{\sqrt{\frac{0.019698}{40} + \frac{0.006626}{20}}} = \frac{0.024}{0.0287} = 0.84$$

$$f = \frac{\left(\frac{0.01969846}{40} + \frac{0.006626}{20}\right)^2}{\frac{\left(\frac{0.01969846}{40}\right)^2}{41} + \frac{\left(\frac{0.00626}{20}\right)^2}{21}} - 2 = 60.9 - 2 = 58.9 \text{ d. f.}$$

t .957 at 60 d. f. = 2.00 $\qquad$ $0.84 < 2.00$

In regard to the question of accuracy the situation is one where the two populations have the same mean but unequal variances[4]. The t test for this particular case as prescribed in the reference cited, was applied to the data to discover the relative accuracies of the two methods of sample ignition. The calculated t was 0.84 with f being equal to 58.9 degrees of freedom as shown in Table III. Since 0.84 is less than the value of

2.00 listed in the t table[5] for 60 degrees of freedom, the closest integer in the table, it may be said that there is no difference in the means of the two methods. Consequently there is no difference in accuracy between igniting the sample with the Bunsen burner and with the automatic electric heater.

It thus appears that eliminating a variable from the general analytical procedure did produce a slight reduction in the overall error inherent in the method. This saving, however, is manifest as a subtle improvement in reproducibility rather than any gain in fundamental accuracy. It may therefore be safely concluded that the machine with its automatic operation is a satisfactory substitute for careful handwork in the combustion of the few samples herein reported.

Acknowledgment

Acknowledgment is hereby made to Mr. *I. D. Carter* and Dr. *R. M. De Baun* of the Mathematical Analysis Group for guidance in the statistical analysis described.

Summary

Comparable series of sulfur determinations by the silver absorbent method were performed on four test samples. One series was carried out with automatic ignition using a stationary electric sample burner during a constant time period for each analysis; the other series by igniting the sample with a Bunsen burner held in the hand until the last trace of sample disappeared.

There was no obviously assured difference in the quality of the analytical figures obtained by the two methods of sample ignition. Statistical analysis of the data, however, disclosed that the automatic burner did actually give a slight improvement in precision over the hand burner although the ultimate limit of accuracy was the same in each case.

Zusammenfassung

Mit vier reinen Verbindungen wurden Reihenbestimmungen des Schwefels durch Verbrennung und Absorption des Schwefeltrioxyds an Silberwolle so ausgeführt, daß eine Reihe von Verbrennungen mit dem von Hand geführten Bunsenbrenner immer einer entsprechenden Reihe von Bestimmungen gegenübergestellt werden konnte, bei der die Verbrennung mit einem ruhenden, automatisch regulierten elektrischen Heizkörper erfolgte.

Die Resultate der automatischen Verbrennungen zeigten eine so geringe Verbesserung gegenüber jenen, die durch Verbrennung mit dem handregulierten Bunsenbrenner erhalten wurden, daß der augenscheinliche Unterschied lediglich dem Zufall zugeschrieben werden könnte. Eine statistische Untersuchung zeigte, daß die automatische Verbrennung tatsächlich eine geringfügige Verbesserung der Präzision gibt, ohne jedoch die Genauigkeit der arithmetischen Mittel der Versuchsreihen merkbar zu ändern.

Résumé

On a effectué des déterminations de soufre en séries comparables par la méthode d'absorption par l'argent sur quatre échantillons types. L'une des séries comportait une combustion automatique à l'aide d'un brûleur électrique fixe pendant un temps constant pour chaque analyse. L'autre série comportait l'emploi d'un bec *Bunsen* conduit à la main pour la combustion de l'échantillon jusqu'à disparition de ses dernières traces.

On n'a constaté aucune différence marquée dans la qualité des résultats analytiques obtenus par l'une ou l'autre méthode de combustion de l'échantillon. L'analyse statistique des résultats obtenus fait cependant apparaître une légère amélioration de la précision lorsque le brûleur automatique est substitué au brûleur à main bien que les écarts extrêmes obtenus soient les mêmes pour chacun des cas.

Literature

[1] *J. Kuck* and *E. Grim,* Mikrochim. Acta [Wien] **1954**, 201.

[2] *W. Dixon* and *F. Massey,* Introduction to Statistical Analysis. New York: McGraw-Hill Book Co. 1951. pp. 88–89.

[3] l. c. p. 312.

[4] l. c. pp. 104–105.

[5] l. c. p. 307.

Contribution from the Microchemical Laboratory of New York University, New York 3, N. Y.

Determination of Non-Aminoid Nitrogen by the Micro-Kjeldahl Method I. Aromatic Nitro Compounds*

By

T. S. Ma, Robert E. Lang,** and **John D. McKinley, Jr.**

(Received December 22, 1956)

Introduction

There are three general methods for the determination of nitrogen in organic compounds. In the Dumas method, the sample is oxidized in the presence of metallic oxide to yield nitrogen oxides which are then reduced to elementary nitrogen. In the ter Meulen method, the compound is catalytically hydrogenated to give ammonia. In the Kjeldahl method, the sample is digested with concentrated sulfuric acid resulting in the formation of ammonium sulfate. All three methods have been adapted to the micro scale: micro-Dumas and micro-Kjeldahl procedures were described in *Pregl*'s classical manual[1], and the ter Meulen micro-procedure[2] has been improved by *Lacourt* and *Chang*[3], and by *Holowchak*, *Wear* and *Baldeschwieler*[4].

At the present time the micro-Dumas method appears to be the preferred procedure among organic microanalysts. The ter Meulen method is seldom employed because of the complexity of the hydrogenation train and the difficulty in the preparation of the catalyst. The micro-Kjeldahl method is a standard technique in the biochemical laboratory, but its use seems to be limited to the routine analysis of proteins and the determination of nitrogen in organic compounds containing the aminoid linkage. Whereas the Kjeldahl method[5] was originally developed for the determination of protein and amide nitrogen, numerous publications have appeared which propose modification of the method in order to adapt it to the determination of nitrogen in other types of organic compounds. The

* To Prof. Dr. *Hans Lieb* at his 70th birthday.

** Department of Chemistry, Brooklyn College, Brooklyn 10, N. Y.

micro-Kjeldahl method has several advantages over the micro-Dumas and ter Meulen methods: Its procedure is simple, rapid, easy to perform, and especially suitable for multiple determinations. For this reason, a project has been initiated in this Laboratory to evaluate the various modifications of the Kjeldahl method and to study its applicability and limitations. In this communication a procedure is described for the determination of nitrogen in aromatic nitro compounds by a modified micro-Kjeldahl method. This procedure has been extensively tested and proved to be generally applicable.

Reduction of Nitro Compounds

The mechanism of the Kjeldahl reaction is still unknown. *Schwab* and coworkers have studied the reaction using aniline as the model compound[6,7]. It has been found that sulfonation takes place followed by oxidation and decomposition, but the manner in which the C—N bond is ruptured to form the H—N bond is obscure. Because concentrated sulfuric acid is a strong oxidizing agent, the Kjeldahl reaction has been called a "wet oxidation" process. However, so far as the nitrogen atom is concerned, the formation of the H—N bond cannot be the result of the oxidation of the C—N bond but that of hydrolytic or reductive cleavage. Some reduction apparently occurs in the digestion process. It has been reported that oximes and nitroso compounds[8], and certain para-nitro compounds[9] give virtually quantitative yields of ammonia on treatment with the regular Kjeldahl procedure. Nevertheless, in order to insure complete conversion of the nitrogen to ammonium sulfate. it is desirable to reduce the nitro group to the amino group prior to the Kjeldahl incineration.

Many reagents have been reported to be suitable for the determination of nitro nitrogen. Among them are organic substances such as phenol[10], resorcinol[11], phloroglucinol[11], 1-naphthol-pyrogallol[12], salicylic acid[13], glucose[14], and thiosalicylic acid[9,15]. The phenolic compounds probably merely serve as fixing agents for the nitro groups, keeping them in solution to be reduced. *Margosches* and *Scheinost* have shown that dinitro- and trinitrophenols do not yield ammonia quantitatively on heating with sulfuric acid and potassium sulfate[16]. Inorganic reducing agents which have been suggested include sodium thiosulfate[17,18], sodium hyposulfite[19,20], and chromous chloride[21]. The last two reagents have to be freshly prepared as they are susceptible to air oxidation. A popular reduction technique recommended by *Roth*[22] and *Grant*[23] makes use of hydriodic acid and is based on the method developed by *Friedrich*, *Kühaas* and *Schürch*[24]. This method entails the removal of the excess reagent by evaporation which is tedious and difficult to control. *Ogg* and *Willits* have reported the result of a collaborative study showing that the method is not always reliable[25].

It is interesting to note that the above mentioned reducing agents are not used in organic synthesis to convert an aromatic nitro compound to the corresponding amine. The synthetic chemist prefers to carry out the reduction by means of a metal and strong acid. *Sah* and *Ma* have applied this procedure to determine nitrogen in nitro compounds by the Kjeldahl method on the macro scale[26]. The sample is weighed on a tin foil, wrapped up in the foil and dropped into the Kjeldahl flask. Granulated zinc is added and the mixture is covered with concentrated sulfuric acid. Gradual heating generates hydrogen to effect the reduction, and the regular Kjeldahl incineration, titration, and distillation follow. Attempts have been made to adapt the procedure to the micro scale by employing the micro tin foil cup used in the Pregl method for methoxyl determination. Unfortunately, it has been found that the inexperienced person has difficulty in confining the sample in the micro cup; the small amount of sulfuric acid used in the micro-Kjeldahl procedure sometimes fails to cover the sample, and this leads to low results. *Fish*[27] has published semi-micro procedure using the tin foil to hold the sample which is then dissolved in a mixture of methanol and acetic acid, followed by reduction with powdered zinc and hydrochloric acid. The authors have found that acidic reduction in organic solvents is suitable for the micro method, and the sample may be advantageously introduced into the micro-Kjeldahl flask by means of the charging tube without the use of the tin foil.

Preliminary Experiments

Preliminary experiments were carried out to study the yield of nitrogen from nitro compounds. Seven dinitro-substituted aromatic hydrocarbons — three isomeric dinitronaphthalenes and four isomeric dinitrobiphenyls — were chosen as test samples. It has been found that 100 mg of zinc allows sufficiently large excess of reducing agent for the treatment of 3 to 8 mg of the nitro compound, and that 2.5 ml of the solvent mixture containing methanol and acetic acid is a convenient volume to be used with the 30-ml micro-Kjeldahl flask. Four sets of experimental conditions have been tested as follows:

Method A. Sample dissolved in 1 ml acetic acid and 1.5 ml methanol, reduced by 100 mg zinc and 0.4 ml hydrochloric acid; digested with 2 ml sulfuric acid and 750 mg potassium sulfate-mercuric oxide-selenium catalyst (prepared by mixing 15 g K_2SO_4, 1 g HgO and 0.5 g Se) for 2 hours.

Method B. Sample dissolved and reduced as in Method A; digested with 2 ml sulfuric acid, 700 mg potassium sulfate and 25 mg selenium catalyst for 1 hour.

Method C. Sample dissolved and reduced as in Method A; digested with 2 ml sulfuric acid, 700 mg potassium sulfate, and 50 mg mercuric oxide for 2 hours.

Method D. Sample dissolved and reduced as in Method A; digested with 2 ml sulfuric acid and 25 mg potassium sulfate-copper sulfate-selenium catalyst (prepared by mixing 3 parts K_2SO_4, 1 part $CuSO_4$, and 1 part Se) for 0.5 hour.

Table I. Preliminary Experiments

Compound	Method A		Method B		Method C		Method D		Theory % N
	Sample mg	Found % N	Sample mg	Found % N	Sample mg	Found % N	Sample mg	Found % N	
2,2′-Dinitrobiphenyl . . .	5.777	11.3	3.614	11.8	4.598	11.6	4.892	5.4	11.47
3,3′-Dinitrobiphenyl . . .	4.580	11.6	4.777	11.8	4.279	11.7	4.580	10.5	11.47
4,4′-Dinitrobiphenyl . . .	6.445	11.6	5.463	11.7	7.134	11.4	5.999	11.3	11.47
2,4′-Dinitrobiphenyl . . .	5.670	11.8	5.267	11.8	6.378	11.2	6.268	7.4	11.47
1,3-Dinitronaphthalene	3.010	13.1	6.136	13.1	—	—	5.460	12.2	12.84
1,5-Dinitronaphthalene	4.568	13.2	4.920	13.1	—	—	5.618	11.9	12.84
1,8-Dinitronaphthalene	4.666	12.7	4.623	12.5	—	—	4.853	11.9	12.84

The experimental results are listed in Table I. It is evident that Method D gives low results while all determinations using Methods A, B, and C are satisfactory. The results seem to indicate that there is no significant difference between digestion time of 1 hour and 2 hours, and between mercuric oxide and selenium as catalyst. Because the use of mercuric oxide entails the incorporation of sodium thiosulfate in the alkali solution for the liberation of ammonia and is accompanied by the precipitation of mercuric sulfide in the distillation flask, selenium is the catalyst of choice. A procedure has been worked out and given to the students taking the course in quantitative organic microanalysis[28] for extensive testing of the method. The procedure is described in the next section.

Recommended Procedure

Reagents:

Glacial acetic acid, C. P.;
Methanol, C. P.;
Zinc metal, powder, or granular, 40 mesh, C. P.;
Concentrated hydrochloric acid, C. P.;
Concentrated sulfuric acid, C. P.;
Potassium sulfate, anhydrous, C. P.;

Selenium metal, powder, C. P.;

Boric acid, 2% solution, prepared by dissolving 20 g of boric acid crystals in 980 ml of boiling distilled water;

Sodium hydroxide, 30% solution, prepared by dissolving 300 g of sodium hydroxide pellets in 700 ml of distilled water.

Standard acid, 0.01 *N* solution. This is conveniently obtained by dissolving exactly 3.8994 g of potassium biniodate ($KIO_3 \cdot HIO_3$), C. P., in a 1-liter volumetric flask and making up to the mark[29]. The potassium biniodate may be dried at room temperature under reduced pressure if necessary, but should not be subjected to evacuation at elevated temperatures. Standard 0.01 *N* HCl or 0.01 *N* H_2SO_4 may be used if available.

Mixed indicator solution. This is prepared by mixing 10 ml of a 0.1% solution of bromcresol green $C_6H_4SO_2OC$ (C_6H_3-3,5-Br_2-2-CH_3-4-OH)$_2$, in 95% ethanol with 2 ml of a 0.1% solution of methyl red (4-$(CH_3)_2NC_6H_4N{=}N$-C_6H_4-2-COOH) in the same solvent. It is not advisable to prepare a large volume of the mixed indicator because the solution deteriorates on long standing. The mixed solution is stored in an amber bottle provided with a dropper drawn out into a fine capillary which delivers approximately 0.05 ml per 4 drops. One bottle of the mixed indicator solution serves for over 200 determinations and keeps for about 6 months.

Procedure:

Reduction and Incineration. From 3 to 8 mg of the compound, corresponding to about 0.5 mg nitrogen, is weighed in a charging tube and transferred into the bottom of a 30-ml micro-Kjeldahl digestion flask. One milliliter of glacial acetic acid is added to dissolve the sample and the flask is warmed, if necessary, to effect solution. Upon cooling, 100 mg of zinc is introduced, followed by 1.5 ml of methanol. Then 2 drops (0.1 ml) of concentrated hydrochloric acid are added to generate hydrogen smoothly and start the reduction reaction. When the evolution of gases slows down, more hydrochloric acid is introduced. Toward the end, the flask is heated over a small flame to keep the evolution of hydrogen proceeding smoothly. About 0.4 ml of concentrated hydrochloric acid is needed to react with the zinc. Two drops of concentrated sulfuric acid are introduced and the reaction mixture is gently boiled to remove the volatile solvents. It is important not to evaporate the contents in the flask to dryness. Upon cooling, 1.5 ml of concentrated sulfuric acid is added and the flask again heated until the solution darkens. The reaction mixture is cooled, 700 mg anhydrous potassium sulfate and 25 mg selenium catalyst are added, followed by 0.5 ml of concentrated sulfuric acid. The incineration step now follows and the solution is boiled gently for 1 hour after it has clarified.

Distillation and Titration. The solution is allowed to cool, and before the reaction mixture completely solidifies, 3 ml of water is carefully introduced along the wall of the digestion flask. The reaction mixture should not be permitted to solidify to a hard mass in the flask, otherwise it is difficult to bring the solid into solution. Now the solution containing ammonium sulfate is ready for distillation. The digestion flask is brought to the micro-Kjeldahl distillation apparatus. A 50-ml Erlenmeyer flask containing 5 ml of 2% boric acid and 0.05 ml of the mixed indicator solution is connected to the condenser. A trace of vaseline is smeared on the lip of the digestion flask and the ammonium sulfate solution is poured into the distilling flask, followed by two or three washings with 2 ml portions of distilled water to effect a quantitative transfer. Upon addition of 15 ml of 30% sodium hydroxide solution, the steam distillation of ammonia is started. The distillation rate should be 4 to 5 ml per minute. When the ammonia begins to come over, the boric acid solution turns from wine red to blue. Two minutes after the color has changed, the Erlenmeyer flask is lowered and the distillation is allowed to continue for 2 more minutes, washing the tip of the condenser with distilled water in the mean time. The condensate in the Erlenmeyer flask is then titrated with 0.01 *N* acid. The end point is a neutral grayish color. One drop (0.02 ml) excess acid gives a pink color which becomes very intense when another drop of acid is introduced.

Calculation. The percent nitrogen is calculated by the following formula.

$$\% \text{ N} = \frac{14.008 \times \text{Normality of acid} \times \text{ml of acid}}{\text{mg sample}} \times 100.$$

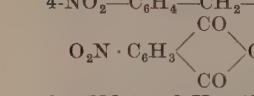
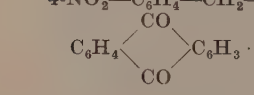
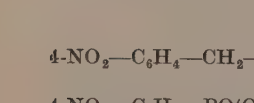
Results and Discussion

The procedure described in this paper has been used in this Laboratory for over 3 years. More than 100 pure aromatic nitro compounds, research substances as well as knowns, have been analyzed and no difficulty has been encountered. Some results are listed in Table II, showing the various types of nitro compounds which have been tested. The precision and accuracy of this method is $\pm$ 0.3% nitrogen.

Table II. Nitrogen Determinations by the Micro-Kjeldahl Method

Compound	Sample mg	Nitrogen Found %	Theory %
1,3,5-$(NO_2)_3$—C_6H_3	5.352	19.9	19.7
2,4,6-$(NO_2)_3$—C_6H_2—CH_3	5.163	18.8	18.5
4-NO_2—C_6H_4—PO(O—C_6H_4—4-NO_2)$_2$	4.926	9.5	9.4
2,4-$(NO_2)_2$—C_6H_3—N(CH_3)—CH(CH_3)—CH_2—C_6H_5	3.988	13.5	13.3
3-NO_2—C_6H_4—C_6H_4—4-NO_2	6.012	11.7	11.5
2-NO_2—C_6H_4—C_6H_4—3-NO_2	6.997	11.2	11.5

(Continuation the table II)

Compound	Sample mg	Nitrogen Found %	Theory %
4-NO_2—C_6H_4—$PO(OH)(O—C_6H_4—4\text{-}NO_2)$	6.680	8.8	8.6
4-NO_2—C_6H_4—CH_2—S—$C(NH)(NH_2)$ · 	6.703	10.0	10.3
2,4-$(NO_2)_2$—C_6H_3—NH—$CH(CH_3)$—CH_2—C_6H_5	5.619	13.9	13.9
4-NO_2—C_6H_4—COOH	5.008	8.2	8.4
4-NO_2—C_6H_4—CO—NH—$CH(C_2H_5)$—CH_2OH	4.402	12.1	12.3
4-NO_2—C_6H_4—CO—NH—$(CH_2)_3$—OH	5.553	12.8	12.5
4-NO_2—C_6H_4—C_6H_4—NH—CO—CH_3	6.240	11.1	10.9
4-NO_2—C_6H_4—CO—NH—$CH(C_2H_5)$—CH_2—OSO_2—C_6H_4—CH_3	5.157	7.1	7.4
4-NO_2—C_6H_4—PO(OH)—NH—C_6H_4—OCH_3	5.876	9.1	9.1
4-NO_2—C_6H_4—PO(NH—C_6H_4—4-$OCH_3)_2$	4.292	10.3	10.2
4-NO_2—C_6H_4—PO(NH—C_6H_4—4-$Cl)_2$	5.291	10.1	10.0
4-NO_2—C_6H_4—PO(OH)—NH—C_6H_4—4-C_6H_5	4.378	8.0	7.9
4-NO_2—C_6H_4—PO_2—NH—C_6H_4—4-Cl	6.626	8.8	9.0
4-NO_2—C_6H_4 + $PO(NH_2)$—C_6H_5	5.360	9.7	10.1
4-NO_2—C_6H_4—PO—$(OSC_4H_9)_2$	4.610	4.4	4.4
4-NO_2—C_6H_4—$PO(OH)_2$ · $C_6H_5NH_2$	4.110	9.2	9.4
4-NO_2—C_6H_4—CH_2—S—$C(NH)$—NH_2 · C_6H_5COOH	5.497	12.5	12.6
4-NO_2—C_6H_4—CH_2—S—$C(NH)NH_2$ · 4-NH_2—C_6H_4COOH	5.152	16.3	16.1
4-NO_2—C_6H_4—CH_2—S—$C(NH)$—NH_2 · $CH(CH_3)_2SO_3H$	6.481	12.3	12.5
4-NO_2—C_6H_4—CH_2—S—$C_9(NH)$—NH_2 · CH_3—C_6H_4—4-SO_3H	7.015	10.8	11.0
4-NO_2—C_6H_4—CH_2—S—$C(NH)$—NH_2 · 4-Br—C_6H_4—SO_3H	6.707	7.4	9.4
4-NO_2—C_6H_4—CH_2—S—$C(NH)$—NH_2 · 4-OH—C_6H_4—SO_3H	6.378	11.0	10.9
$(4\text{-}NO_2$—C_6H_4—CH_2 + S—$C(NH)$—$NH_2)_2$ · 2,7-$(SO_3H)_2$—$C_{10}H_6$	4.887	11.8	11.8
4-NO_2—C_6H_4—CH_2—S—$C(NH)$—NH_2 · 2-OH—7-SO_3H—$C_{10}H_6$	4.505	9.9	9.7
4-NO_2—C_6H_4—CH_2—S—$C(NH)$—NH_2 · 	6.158	8.4	8.4
4-NO_2—C_6H_4—CH_2—S—$C(NH)$—NH_2 · 	7.513	9.2	9.5
4-NO_2—C_6H_4—$PO(OH)_2$ · C_6H_5—CH_2—S—$C(NH)$—NH_2	5.373	11.6	11.6
4-NO_2—C_6H_4—NH(OH)	2.906	18.2	18.2

It may be worthy of mention that the modified micro-Kjeldahl method gives excellent results for compounds containing two or more nitro groups. Polynitro compounds are difficult to handle in the micro-Dumas procedure because of the danger of explosion, and *Holowchak*[30] has reported that the ter Meulen method tends to give low results for dinitro- and trinitro-compounds.

Whereas an occasional single determination by the modified micro-Kjeldahl method is not as convenient as by the micro-Dumas method since the time required for the reduction and incineration steps is over 1 hour, the micro-Kjeldahl procedure is highly recommended for routine work. A series of six or more samples may be treated simultaneously on the digestion rack and the determinations can be completed in about 3 hours.

It is interesting to note that the amount of selenium catalyst and the time of incineration required for the quantitative yield of ammonia is considerably increased when the reduction step is included in the micro-Kjeldahl procedure. Nitrogen in aliphatic and aromatic amines, as well as amides and anilides, is determined in this Laboratory by the procedure described by *Ma* and *Zuazaga*[31]. One milliliter of concentrated sulfuric acid and 15 mg of potassium sulfate-copper sulfate-selenium catalyst are used with a 10-ml Kjeldahl digestion flask, and the digestion time is always within 10 to 20 minutes. It is not advisable to increase the amount of catalyst and to prolong the digestion time as this may lead to loss of nitrogen as has been reported by *Patel* and *Sreenivasan*[32].

Summary

A program has been initiated to evaluate the various modifications of the micro-Kjeldahl method and study their application and limitations for the determination of nitrogen in non-aminoid compounds. This paper describes a procedure for aromatic nitro compounds. The sample (3 to 8 mg) is weighed directly into a 30-ml micro-Kjeldahl flask, dissolved in 1 ml acetic acid and 1.5 ml methanol, and reduced with 100 mg zinc metal and 0.4 ml hydrochloric acid. Two drops of concentrated sulfuric acid are added and the organic solvents are removed by heating. The product is then incinerated with 2 ml sulfuric acid, 700 mg potassium sulfate, and 25 mg selenium catalyst. Regular micro-Kjeldahl distillation follows, the ammonia being absorbed in 2% boric acid and titrated with 0.01 *N* potassium biniodate using methyl red–bromcresol green mixed indicator. More than 100 mono- and poly-nitro compounds have been tested by this method; no difficulty has been encountered. Precision and accuracy are within $\pm$ 0.3% nitrogen.

Zusammenfassung

Es wurde begonnen, die verschiedenen Ausführungsformen der Mikro-Kjeldahl-Bestimmung für Stickstoff in nichtaminoider Bindung zu prüfen. Diese Mitteilung beschreibt ein Verfahren für die Behandlung aromatischer Nitroverbindungen. Die Probe von 3 bis 8 mg wird unmittelbar in einen 30-ml-Kjeldahlkolben eingewogen, in 1 ml Essigsäure und 1,5 ml Methylalkohol gelöst und mit 100 mg metallischem Zink und 0,4 ml Salzsäure reduziert. Zwei Tropfen konz. Schwefelsäure werden zugesetzt und hierauf die organischen Lösungsmittel abgedampft. Zur Verbrennung der organischen Substanz werden 2 ml konz. Schwefelsäure, 700 mg Kaliumsulfat und 25 mg Selenkatalysator zugefügt. Bei der dann folgenden üblichen Kjeldahl-Destillation wird 2%ige Borsäurelösung vorgelegt, die dann mit 0,01-n Kaliumbijodatlösung gegen eine Mischung von Methylrot und Bromkresolgrün titriert wird.

Die Anwendung auf mehr als 100 Mono- und Polynitroverbindungen begegnete keinerlei Schwierigkeiten. Präzision und Genauigkeit liegen innerhalb $\pm$ 0,3% Stickstoff.

Résumé

Mise au point d'un programme de travail pour évaluer les différentes modifications de la méthode de Kjeldahl, étudier leur application et leurs limitations dans le cas du dosage de l'azote dans les composés non aminoides. Dans la présente communication on décrit un mode opératoire pour les composés aromatiques nitrés. L'échantillon (3 à 8 mg) est directement pesé dans un micro-matras de Kjeldahl de 30 ml, dissous en 1 ml d'acide acétique et 1,5 ml de méthanol et réduit par 100 mg de zinc métallique et 0,4 ml d'acide chlorhydrique. On ajoute deux gouttes d'acide sulfurique concentré et élimine les solvants organiques par chauffage. Le produit est alors attaqué par 2 ml d'acide sulfurique en présence de 700 mg de sulfate de potassium et 25 mg de sélénium catalyseur. On effectue ensuite une distillation classique de micro-Kjeldahl, absorbe l'ammoniac dans une solution d'acide borique à 2% et titre avec du biiodate de potassium 0,01 N en présence de l'indicateur mixte rouge de méthyle vert de bromocrésol. Plus de cent dérivés mono et polynitrés ont été analysés par cette méthode sans difficulté apparente. La précision et l'exactitude correspondent à moins de $\pm$ 0,3% d'azote.

Literature

[1] *F. Pregl*, Quantitative Organic Microanalysis, translated by *E. Fyleman*. Philadelphia: Blakiston. 1924.

[2] *H. ter Meulen*, Rec. trav. chim. Pays-Bas **49**, 396 (1930).

[3] *A. Lacourt* and *C. F. Chang*, Bull. soc. chim. Belgique **49**, 167 (1940).

[4] *J. Holowchak, G. E. C. Wear* and *E. L. Baldeschwieler*, Analyt. Chemistry **24**, 1754 (1952).

[5] *C. Kjeldahl*, Z. analyt. Chem. **22**, 366 (1883).

[6] *G. M. Schwab* and *E. Schwab-Agallidis*, J. Amer. Chem. Soc. **73**, 803 (1951).

[7] *G. M. Schwab* and *S. Caramos*, Mh. Chem. **86**, 341 (1955).

[8] *F. Zinneke*, Angew. Chem. **64**, 220 (1952).

[9] *P. R. W. Baker*, Analyst **80**, 481 (1955).

[10] *J. Jodlbauer*, Chem. Zbl. **57**, 433 (1866).

[11] *B. M. Margosches* and *E. Scheinost*, Ber. dtsch. chem. Ges. **58**, 1857 (1925).

[12] *R. B. Breadstreet*, Analyt. Chemistry **26**, 235 (1954).
[13] *W. C. Cope*, Ind. Eng. Chem. **8**, 592 (1916).
[14] *A. Elek* and *H. Sobotka*, J. Amer. Chem. Soc. **48**, 501 (1926).
[15] *P. McCutchan* and *W. F. Roth*, Analyt. Chemistry **24**, 369 (1952).
[16] *B. M. Margosches* and *E. Scheinost*, Ber. dtsch. chem. Ges. **58**, 1855 (1925).
[17] *H. Grillemond*, Bull. soc. chim. France **1**, 196 (1907).
[18] *R. B. Bradstreet*, Analyt. Chemistry **21**, 1012 (1949).
[19] *W. E. Shaefer* and *W. W. Becker*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **19**, 307 (1947).
[20] *Al Steyermark*, Quantitative Organic Microanalysis. Philadelphia: Blakiston. 1951. p. 134.
[21] *R. Belcher* and *M. K. Bhatty*, Analyst **81**, 125 (1926).
[22] *H. Roth* in *Müller-Houben-Weyl*, Methoden der Organischen Chemie, 4th ed., vol. 2. Stuttgart: Thieme. 1953. p. 191.
[23] *J. Grant*, Quantitative Organic Microanalysis based on the Methods of Fritz Pregl. London: Churchill. 1951. p. 100.
[24] *A. Friedrich*, *E. Kühaas* and *R. Schürch*, Z. physiol. Chem. **216**, 68 (1933).
[25] *C. L. Ogg* and *C. O. Willits*, J. Assoc. Off. Agric. Chemists **35**, 288 (1952).
[26] *P. P. T. Sah* and *T. S. Ma*, Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 1633 (1932).
[27] *V. B. Fish*, Analyt. Chemistry **24**, 760 (1952).
[28] *T. S. Ma* and *R. F. Sweeney*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 197.
[29] *J. B. Niederl*, *V. Niederl* and *M. Eitingon*, Mikrochem. **25**, 143 (1938).
[30] *J. Holowchak*, private communication.
[31] *T. S. Ma* and *G. Zuazaga*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **14**, 280 (1942).
[32] *S. M. Patel* and *A. Sreenivasan*, Analyt. Chemistry **20**, 63 (1948).

The Analytical Laboratories, Fordham University, New York 58, N. Y.

Aureomycin Nitrate, Its Preparation and Identification*

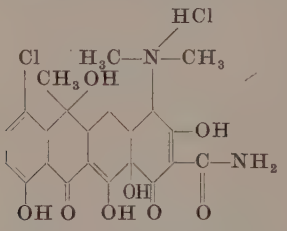
By

Patricia L. Payton, Michael Cefola, and **Leo K. Yanowski**

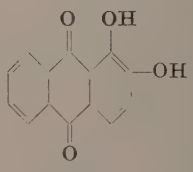
With 10 Figures

(Received February 6, 1957)

Because of the similarity in structure of the aureomycin (chlortetracycline) molecule to that of alizarin, shown below, an investigation was initiated to study the chelating ability of the former compound for many of the common cations, including aluminum and zirconium, which are presently quantitatively determined by alizarin. A closer examination of the molecule in question reveals many more centers for chelation than the alizarin structure.



Aureomycin Hydrochloride



Alizarin

To test the usefulness of aureomycin as a colorimetric or microchemical reagent for metallic ions, it was decided to record the color phenomena obtained with various metal ions and also the appearances observed under the microscope of any solid products formed. It soon became evident that aureomycin reacts more characteristically with anions than with cations, and systematic trials with anions led to the discovery of the low solubility and the crystalline character of the aureomycin nitrate, properties which are of interest in the preparation and identification of the compound.

* Dedicated to Prof. Dr. *Hans Lieb* at his 70th birthday.

Experiments

A saturated solution (14 mg/ml at 25° C)[1] of aureomycin hydrochloride ($C_{22}H_{23}N_2ClO_8 \cdot HCl$), having a p_H of 2.8 to 2.9, was used in preference to a solution of the free base with lesser stability. Because also solutions of the hydrochloride decompose noticeably within about four days, the reagent solution was kept under refrigeration when not in use. If the p_H of the solution is increased to 5, the free base precipitates, which has a solubility of 0.5 to 0.6 mg/ml[1] and is unstable in an alkaline medium.

The test solutions were made up to contain 10 mg of the respective ion per milliliter. In each instance, a drop of the test solution was treated on a microscope slide with a drop of the reagent according to method I of *Chamot* and *Mason*[2].

No precipitations were obtained with aluminum nitrate, cerium(IV) sulfate, cerium(III) nitrate, cobalt nitrate, copper nitrate, iron(III) nitrate, lanthanum chloride, lithium chloride, mercury(II) nitrate, nickel nitrate, zinc nitrate, and zirconium(IV) nitrate.

Most of the common cations gave crystalline precipitates which were white or colorless if the cation was supplied as the chloride. This happened among others also with antimony(III) chloride in 6 *M* HCl, arsenic(III) in 6 *M* HCl, and with tin(II) chloride in 6 *M* HCl, whereby the last mentioned did not give well developed crystals. The white (colorless) crystals obtained with chlorides closely resembled the orthorhombic[3,4] crystals of aureomycin hydrochloride (Fig. 1). Obviously, in all these instances the reagent had separated.

The nitrates of sodium, potassium, ammonium (Figs. 2 and 3), as well as those of barium, bismuth, cadmium, calcium, chromium, lead, magnesium, manganese, and strontium produced yellow precipitates with well developed crystals (Figs. 4 to 8).

With aqueous or alcoholic solutions of iron(III) salts, phenols give red, violet or deep green water-soluble complex iron(III) phenolates[5]. Similar colors are obtained with aureomycin and iron(III) nitrate; this is to be expected from the presence of phenolic groups, but does not exclude the possibility of chelate formation.

Because of the similarity of crystals obtained with the nitrates of potassium, sodium, ammonium, etc., further investigations were carried out to determine the exact nature of such precipitates. To ascertain if sodium or potassium were present in the crystals formed from their respective nitrate solutions, samples were ashed in a platinum crucible. The small residues were dissolved in water and tested in a flame with a platinum wire. Neither cation was detected.

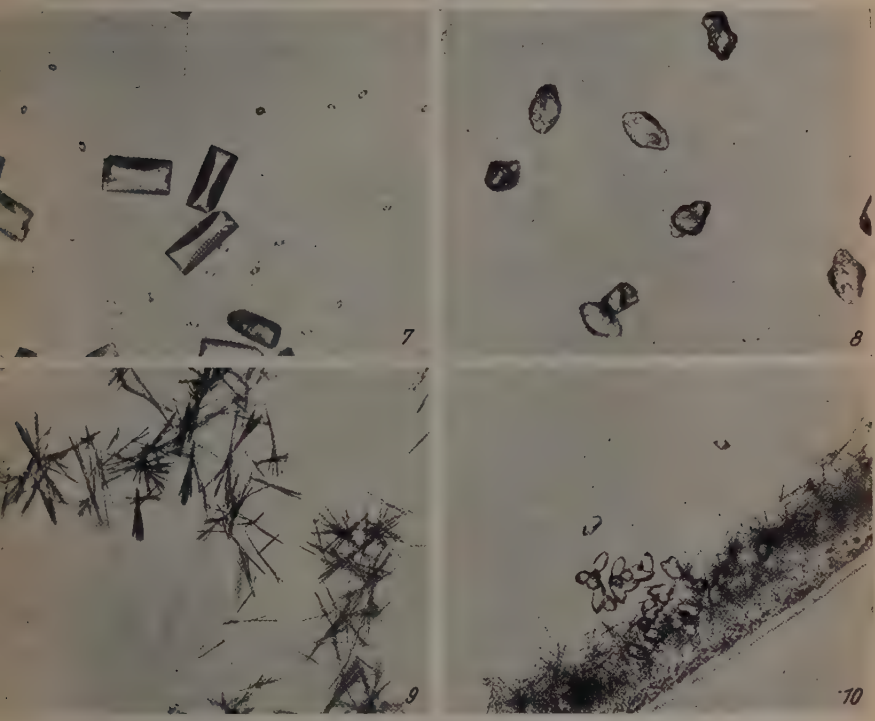
If salts of these cations had formed, then the p_H of the solutions of these compounds would differ from the acidic value of the original

Figs. 1—6. Aureomycin Hydrochloride and its Precipitates with Various Nitrate Solutions, 100×

(*1*) Aureomycin Hydrochloride; (*2*) Potassium; (*3*) Sodium; (*4*) Magnesium; (*5*) Barium; (*6*) Calcium

aureomycin hydrochloride reagent. However, a p_H of 2.85, the same as the hydrochloride, was obtained with a Beckman p_H Meter.

The possibility of a mere "salting out" of the aureomycin hydrochloride was eliminated by X-ray analysis of the reagent and the crystals from the sodium nitrate solution. The results established them as different



Figs. 7—10. Aureomycin and Precipitates with Various Nitrate Solutions, 100×
(*7*) Chromium, (*8*) Bismuth; (*9*) Free Base;
(*10*) Mixture of Crystals of the Nitrate and the Free Base

compounds. Solutions of both were also tested with silver nitrate. In the hydrochloride solution, silver chloride precipitated, while the other remained clear.

The similarity of the crystals resulting from the cation nitrates when combined with saturated aureomycin hydrochloride indicated the possibility of a nitrate formation. To one drop of a solution of these crystals, placed in a white spot plate depression, was added one drop of diphenylamine in concentrated sulfuric acid[6]. A greenish blue color

was observed, signifying the presence of an oxidant. No blue color was obtained with the same test on the hydrochloride solution.

Further evidence for nitrate was the formation of crystals with lithium nitrate and saturated aureomycin hydrochloride. These crystals, similar to those resulting from the sodium, potassium and ammonium solutions, were not formed with the lithium chloride which had been previously used as a test solution.

The diphenylamine test for the nitrate group was positive for all crystals obtained from all the nitrate test solutions listed above. To determine the absence of each cation, the precipitates resulting from the interaction of the nitrate salts with the aureomycin hydrochloride were dissolved and tested for the individual cations by spot tests[6] and the results are listed in Table I.

Table I. Tests for Presence of Cation in Precipitate

Cation of Reagent	Spot Test	Result
NH_4	Formation of ammonia	positive
Ba	Induced precipitation of lead sulfate	negative
Bi	Cinchonine and potassium iodide	negative
Cd	Diphenylcarbazone in 1% EtOH	negative
Ca	Precipitation of calcium oxalate[7]	negative
Cr(III)	Benzidine after conversion to chromate	negative
Pb	Dithizone in CCl_4	negative
Li	Flame test[7]	negative
Mg	Alkaline solution of Titan Yellow	negative
Mn(II)	Benzidine	negative
K	Flame test[7]	negative
Na	Flame test[7]	negative
Sr	Flame test[7]	negative

Each spot test was performed simultaneously on the cation test solution as a check of its validity. It was discovered that the test for NH_4 by ammonia formation was not valid since the original aureomycin hydrochloride also gave a positive reaction. However, on the basis of the other results, it could safely be assumed that the ammonium cation was not part of the crystalline compound.

If chelate rings were produced with the multivalent cations, the spot tests performed here would give negative reactions. For this reason crystals given by strontium and chromium were ashed in a platinum crucible. After dissolving the residues in dilute nitric acid, tests for the cations were carried out by the procedures of Table I. Negative results were again obtained.

The crystals from the bismuth nitrate solution appeared to be somewhat different from the others (Fig. 8), but X-ray analysis established their structure to be identical with that of the crystals obtained from sodium nitrate.

Additional evidence for the presence of an insoluble nitrate salt of aureomycin is available from infra-red spectroscopy. The final proof

of the formation of the nitrate salt of aureomycin, $C_{22}H_{23}N_2ClO_8 \cdot HNO_3$, was a quantitative microanalysis of the crystals. The values are summarized in Table II. The molecular weight was found by titration in 50% dimethyl formamide-water mixture and gave a neutralisation equivalent of 548 as compared with the calculated value of 542.

In order to establish the sensitivity of the reagent for the detection of the nitrate radical, an attempt was made to determine the limit of identification[6]. By diluting the test solution of sodium nitrate to a concentration of 1 mg/ml and testing a drop of it with an equal amount of saturated aureomycin hydrochloride reagent, a mixture of crystals of the nitrate and the free base was obtained (Figs. 9, 10). It is apparent therefore, that even water alters the hydrogen ion concentration sufficiently to cause the precipitation of the free base and consequently it is somewhat difficult to ascertain the limit of identification for the nitrate group.

Table II. Analyses of Nitrate Precipitate

Element	Found %	Calculated %	Difference %
C	49.32	48.75	+ 0.57
	49.21		+ 0.46
H	4.66	4.43	+ 0.23
	5.03		+ 0.60
N	7.38	7.76	— 0.38
	7.52		— 0.24
Cl	6.52	6.56	— 0.29
	6.27		— 0.02

The result of the previous experiments, i. e., the formation of a nitrate salt of aureomycin, suggested the investigation at the action of the reagent toward other anions. Test solutions of 10 mg/ml were prepared and treated with saturated aureomycin hydrochloride in the same manner as the cations.

The rhombic shaped bodies produced with the chloride solution were evidently the hydrochloride of aureomycin. The needle-like structures resulting from the AsO_4^{3-}, F^-, NO_2^-, $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}, PO_4^{3-}, and SiO_3^{2-} solutions closely resembled the free base (Fig. 9). Melting points of the free base and crystals formed with HPO_4^{2-} proved them to be identical, i. e., they both melted at 168–9° C. It can be readily seen that hydrolysis caused the free base to precipitate in these cases. However, even with test solutions of salts formed from a weak base, e. g., $(NH_4)_2HPO_4$ and $(NH_4)_2SO_4$, no characteristic crystals were obtained. In fact the $(NH_4)_2HPO_4$ solution also brought about the precipitation of the free base.

The limits of identification, determined for the amorphous precipitates produced by MoO_4^{2-}, WO_4^{2-}, and VO_4^{2-} were 0.2 mg, 0.5 mg, and 1 mg, respectively.

Bromide, carbonate, chlorate, iodate, thiosulfate, and persulfate gave precipitates revealing no characteristic forms under the microscope. No precipitations were obtained with iodide, bisulfate, sulfate, and thiocyanate.

Acknowledgment

The authors are grateful to Dr. *Coy W. Waller* of the Lederle Laboratories Division, American Cyanamid Company for supplying the inspiration as well as the reagent, to Mr. *Louis M. Brancone*, also of Lederle Laboratories, for his microanalysis of the nitrate salt of aureomycin and to Dr. *Richard L. Wagner*, Jr., of Charles Pfizer Company for supplying the infrared spectrograms.

Summary

Aureomycin hydrochloride does not show any promise as a reagent for qualitative detection or quantitative estimation of any of the common cations or anions. The well developed crystals of the rather insoluble nitrate may be used for the identification of aureomycin. The low solubility of the nitrate may give a better stability as compared with the hydrochloride, which would be of interest to the pharmacist.

Zusammenfassung

Versuche mit Aureomycinhydrochlorid gaben keine Anhaltspunkte für eine Eignung dieser Verbindung als Reagens für die Auffindung oder Bestimmung der häufig angetroffenen Kationen oder Anionen. Die gut ausgebildeten Kristalle des wenig löslichen Nitrats können für die Erkennung von Aureomycin benützt werden. Die geringe Löslichkeit des Nitrats erhöht dessen Beständigkeit im Vergleich zum Hydrochlorid, was für Pharmazeuten von Interesse sein könnte.

Résumé

Le chlorhydrate d'auréomycine ne montre aucune propriété intéressante comme réactif de recherche qualitative ou d'estimation quantitative des cations et anions courants. On peut utiliser les cristaux bien développés de son nitrate assez peu soluble pour identifier l'auréomycine. La faible solubilité de ce nitrate peut lui conférer une meilleure stabilité que celle du chlorure ce qui est digne d'intérêt pour les pharmaciens.

Literature

[1] *R. W. Braschard, A. C. Dornbush, S. Gordon*, et al., Science **109**, 199–200 (1949).

[2] *R. M. Chamot* and *C. W. Mason*, Handbook of Chemical Microscopy, Vol. II, 2nd ed. New York: Wiley. 1940.

[3] *J. D. Dunitz* and *J. E. Leonard*, J. Amer. Chem. Soc. **72**, 4276–7 (1950).

[4] *J. Krc* and *W. C. McCrone*, Analyt. Chemistry **22**, 1576–7 (1950).

[5] *F. Feigl*, Chemistry of Specific, Selective and Sensitive Reactions. New York: Academic Press. 1949.

[6] *F. Feigl*, Qualitative Analysis by Spot Tests, 3rd ed. New York: Elsevier. 1946.

[7] *P. Arthur* and *O. M. Smith*, Semimicro Qualitative Analysis, 3rd ed. New York: McGraw-Hill. 1952.

[8] *F. A. Miller* and *C. H. Wilkins*, Analyt. Chemistry Vol. **24**, 1253 (1952).

Aus dem Biochemischen Institut der Medizinischen Fakultät und dem Chemischen Institut der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Alexandria

Ein Lockstoffanalysator (Odouranalyser) für Insekten*

Von

B. Flaschenträger, El Sayed Amin und H. J. Jarczyk

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 23. Januar 1957)

Die Grenzen der Nachweisbarkeit chemischer Substanzen werden mit der Erfassungsgrenze nach *F. Feigl*[1] und der Grenzkonzentration nach *F. L. Hahn*[2] genau bezeichnet. Sie hängen von der Empfindlichkeit der jeweiligen chemischen Reaktion und der Durchführungsart des Substanznachweises ab. Die Erfassungsgrenze ist die kleinste Menge an Substanz, ausgedrückt in Mikrogramm (μg), die durch eine Reaktion oder Methode, gleichgültig in welchem Volumen, noch auffindbar ist.

Nach *Ida Noddack*[3] findet sich jedes chemische Element in allen irdischen Substanzen, also auch in allen Lebewesen („Allgegenwart der Elemente"), sein Nachweis ist jedoch abhängig von der Empfindlichkeit der jeweiligen Methode.

Nach *Feigl*[1] kann als äußerste chemische Erfassungsgrenze für ein Element, z. B. für Quecksilber, noch 0,001 μg angegeben werden. Radioaktive Elemente kann man mit Hilfe des Geiger-Zählers noch in Verdünnungen von 10^{-9} nachweisen. Zu den empfindlichsten Reaktionen gehören die der Fermente. Sie reagieren auf geringste Spuren ihrer Substrate und Effektoren (Aktivatoren und Paralysatoren). Diese können daher zu ihrem Nachweis verwendet werden. So lassen sich z. B. mit der Peroxydasereaktion noch Spuren von Eisen oder Hämoglobin und schließlich auch Blut noch in einer Verdünnung von $1:10^6$ nachweisen.

Vitamine werden als Teile von Fermenten (Co-Enzyme) wirksam und können über eine biologische Reaktion (Avitaminose) am Tier noch in

* Herrn Univ.-Prof. Dr. *Hans Lieb*, dem Mitbegründer der organischen Mikroanalyse, zum 70. Geburtstag in Dankbarkeit und mit besten Wünschen gewidmet.

kleinsten Mengen quantitativ bestimmt werden (prophylaktischer und kurativer Test). Das Vitamin B_{12} ist z. B. beim Erwachsenen noch in Mengen von 0,001 bis 0,003 μg wirksam. Angenommen, es würde sich auf 70 kg gleichmäßig verteilen, dann würde es noch in einer Verdünnung von $1:7 \cdot 10^{13}$ wirken.

Auf welchem Wege die *Hormone* wirken, ist noch nicht geklärt. Jod erfährt durch den Einbau in Thyreoglobolin eine Wirksamkeitssteigerung von $1:10^8$, gemessen am Metamorphosetest an Kaulquappen. Es mehrt sich nun immer mehr die Erfahrung, daß alle Stoffe, die in Spuren irgendeine biologische Wirkung entfalten, dies durch die Beteiligung an einer Fermentreaktion tun. Dies gilt für Spurenelemente, lebensnotwendige Aminosäuren und Fettsäuren, Vitamine, Hormone, Gifte und Pharmaka, kurz für alle Wirkstoffe. Läßt man diese Arbeitshypothese gelten, dann kann man auch die Wirkung der Erbfaktoren (Gene)[4] und der krebserregenden Stoffe[5] durch das Aufsuchen der betreffenden Fermentreaktionen zu verstehen versuchen.

Das gleiche gilt für die Riech- und Geschmackstoffe. Wir wissen heute noch nicht, wie die Phänomene des Geruchs und Geschmacks ausgelöst werden[6]. Wir nehmen an, daß auch sie durch Fermentreaktionen zustande kommen.

Die Fähigkeit zu riechen, ist für die meisten Insekten lebensnotwendig und daher auf das Höchste entwickelt. Von den etwa 600000 verschiedenen Insektenarten locken sich die Männchen und Weibchen entweder durch Töne[7] oder durch Lockstoffe oder Farben an. Über die Erzeugung elektromagnetischer Wellen durch Insekten wissen wir heute noch nichts. Angenommen, nur etwa die Hälfte der Insektenarten locke sich durch chemische Stoffe an, so bleiben immerhin noch 300000 wahrscheinlich verschiedene chemische Verbindungen, die bis jetzt völlig unbekannt sind. Ein großes Arbeitsfeld liegt hier noch unbeackert. Über Lockstoffe haben *Haller*[8] Versuche am Schwammspinner (Gipsy moth), *Butenandt*[9] Versuche an Seidenspinnern (Bombyx mori) und *Flaschenträger*[10] Versuche an Baumwollschädlingen (Prodenia litura, Aegrotis ypsilon und Pink bollwurm) angestellt, die keinen Zweifel daran lassen, daß es sich um chemische Verbindungen, sogenannte Sexuallockstoffe (Sex attractants) handelt. *Butenandt*[9] ist kürzlich die Isolierung eines kristallisierten Esters des Lockstoffes aus weiblichen Seidenspinnern gelungen. *Dethier*[11] hat in seinem Buch die ältere Literatur über Lockstoffe zusammengestellt.

Als wir 1946 begannen, die Lockstoffe von Baumwollschädlingen zu untersuchen, die ja weit außerhalb der direkten Erfassungsgrenze in einem Schmetterling vorhanden sind, war es für uns nötig, zuerst eine Apparatur zu schaffen, die es erlaubt, einen jeweiligen Lockstoff nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ zu testen. Als Indikator für diese Verbindungen können vorerst keine chemischen Reaktionen heran-

gezogen werden. Dagegen gelingt es, männliche Schmetterlinge mit ihren hochempfindlichen Riechorganen in den Antennen als Indikator zu benützen.

Apparate zur Bestimmung des Geruchsvermögens von Menschen und Tieren sind in der Literatur vielfach bekannt. *Dethier*[11] hat in seinem Buch eine Reihe von Olfaktometern beschrieben, die im wesentlichen darin bestehen, daß ein mit einem Duftstoff versehener Luftstrom den Insekten entgegengeführt wird und diese dann anlocken. Nach demselben Prinzip, aber, wie wir glauben, wesentlich einfacher, und nicht nur für qualitative, sondern auch quantitative Auswertung, arbeitet unser Riechstoffanalysator. Im Prinzip besteht er aus zwei Rotweinflaschen, in deren

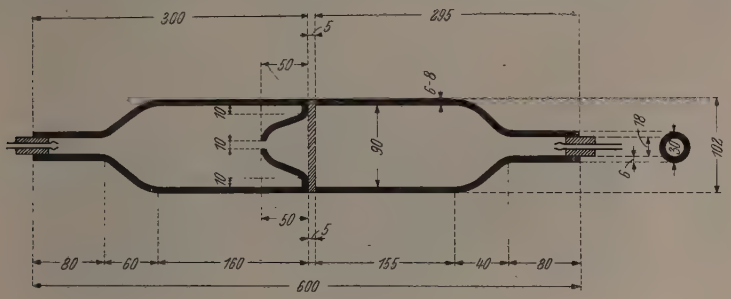


Abb. 1. Lockstoffanalysator (Maße in mm)

einer die Männchen die Möglichkeit haben, durch den durchbohrten konischen Boden in die andere Flasche hinüberzukriechen, und zwar entgegen dem Lockstoff enthaltenden Luftstrom. Wie aus der Abb. 1 ersichtlich, ist der Boden der einen Flasche abgesprengt und die Wand der Flasche plan geschliffen. Der Boden der anderen Flasche ist ebenfalls plan geschliffen, aber an der Spitze des konischen Bodens ist ein 1 cm weites Loch gebohrt. Die beiden Flaschen werden mit einem Korkring als Dichtung mit Hilfe einer eisernen Haltevorrichtung luftdicht und stabil zusammengeschraubt. Seinerzeit verwendeten wir nur einen Autoschlauch als Dichtung und zur Verbindung. Werden nun in die eine Flasche 10 Männchen eingesetzt, in einen Destillierkolben (3 Liter) 30 Weibchen auf Filtrierpapier gehalten, und nach einer Stunde, in der sich die Tiere wieder beruhigt haben, ein schwacher Luftstrom (etwa 2 Blasen in der Sekunde) durch das ganze System (s. Abb. 2) gesaugt, dann kriechen, sofern Duftstoff vorhanden ist, je nach der Stärke der Anlockung und der Aktivität der männlichen Schmetterlinge diese durch die Bohrung in die andere Flasche (Testflasche). Je nach der Zahl der in der Testflasche nach einiger Zeit vorhandenen Männchen, kann die Menge des Lockstoffes quantitativ in Prozenten ausgewertet werden; wenn z. B. von 10 Männchen 8 hinüberkrochen, entspricht dies 80% Anlockung.

Schaltet man zwischen dem Destillierkolben mit den Weibchen als dem Odour developper geeignete Waschflaschen und Dewar-Gefäße ein, so kann man den Lockstoff ausfrieren und feststellen, bei welchen Temperaturen Männchen noch angelockt werden. Durch Verwendung bestimmter chemischer Reagenzien in den Waschflaschen, z. B. Säuren, Basen, Oxydations- und Reduktionsmitteln, Aldehydreagenzien usw., kann man die chemische Natur des Lockstoffes an der positiven oder negativen Reaktion der Männchen feststellen. Verwendet man an Stelle der lebenden Weibchen Extrakte aus dem Abdomen der Weibchen, so läßt sich die Anreicherung und Beständigkeit des Lockstoffes getrennt von den Weibchen ebenfalls qualitativ und quantitativ verfolgen. Früher verwendeten

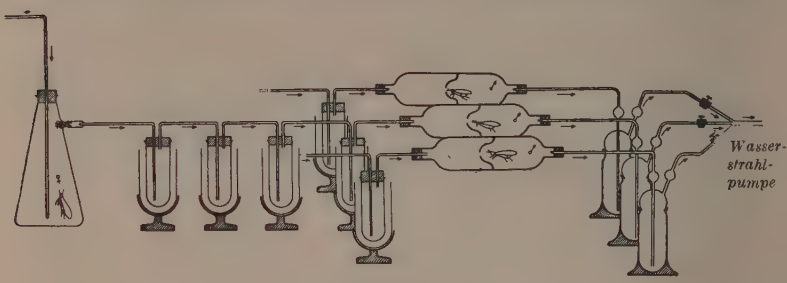


Abb. 2

wir je 3 Flaschenpaare mit im ganzen 30 Männchen, aber ohne Kontrollen mit lebenden Weibchen; in letzter Zeit hat sich jedoch gezeigt, daß neben dem Hauptversuch gleichzeitig zwei Kontrollversuche laufen müssen, einer mit etwa 20 lebenden Weibchen und 10 Männchen und ein Leerversuch nur mit 10 Männchen. Die Weibchen und die Männchen müssen in weit voneinander getrennten Räumen gezüchtet werden, damit sie nicht schon vorher durch den Lockstoff beeinflußt werden. Es ist sehr wichtig, daß durch die Apparatur Frischluft von außen geleitet wird. Auch ist zu berücksichtigen, daß der Versuch zu einer Tagesstunde angestellt wird, in der die Schmetterlinge ihre höchste Aktivität entfalten (Schwarmzeit während der Abenddämmerung und Nacht). Einmal in Gang gesetzt, kann der Versuch während der Nacht allein laufen und das Ergebnis am nächsten Morgen abgelesen werden.

In dem Lockstoffprüfer können nicht nur Sexuallockstoffe kontrolliert werden, sondern auch Lockstoffe im Futter (food attractants).

Nach demselben Prinzip kann ein Lockstoffanalysator durch Zusammenschmelzen zweier Reagensgläser mit einer konisch ausgezogenen Öffnung in der Mitte hergestellt werden, indem man die Anlockung kleiner Raupen und Insekten, z. B. Anopheles, durch bestimmte Futterstoffe studieren kann.

Wir glauben, daß das Arbeiten mit dem Lockstoffanalysator eine neue mikroanalytische Methode ist, die erlaubt, mit kleinsten Mengen und in größten Verdünnungen noch Verbindungen nachzuweisen, die nur von den Riechorganen von Insekten erfaßt werden können.

Wir sprechen der Deutschen Forschungsgemeinschaft für das dem einen von uns (H. J. J.) bewilligte Forschungsstipendium unseren besten Dank aus.

Zusammenfassung

Auf die Möglichkeit des spezifischen Nachweises von Substanzen mit Hilfe der außerordentlich feinen Geruchsorgane von Insekten wird hingewiesen. Eine erprobte Apparatur wird als Lockstoffanalysator (Odouranalyser) an Hand von Abbildungen beschrieben, die durch Abfangen angelockter männlicher Insekten *(Prodenia litura)* die quantitative Auswertung der weiblichen Lockstoffe mit einfachen Mitteln erlaubt.

Summary

Attention is directed to the possibility of the specific detection of substances with the aid of the exceptionally sensitive sense of smell of insects. A tested apparatus is described (including diagrams) which served as the odor analyzer, and which by the capture of attracted male insects *(Prodenia litura)* permits the quantitative evaluation of the female enticement substance with simple means.

Résumé

Indications sur la possibilité d'identification spécifique des substances fondée sur l'extraordinaire sens de l'odorat des insectes. Description d'un analyseur d'odeurs (Odouranalyser) éprouvé d'après figures. La capture d'insectes mâles *(Prodenia litura)* permet d'évaluer quantitativement les odeurs femelles qui les attirent à l'aide de moyens simples.

Literatur

[1] *F. Feigl*, Mikrochem. **1**, 4 (1923); Qualitative Analyse mit Hilfe von Tüpfelreaktionen. 2. Aufl. Leipzig: 1935; Spot Tests Vol. I und II. Amsterdam: Elsevier. 1954.

[2] *F. L. Hahn*, Mikrochem. **8**, 75 (1930).

[3] *I. Noddack*, Z. angew. Chem. **49**, 835 (1936).

[4] *A. Butenandt*, Naturwiss. **42**, 141 (1955).

[5] *H. Druckrey*, Krebs, in *B. Flaschenträger* und *E. Lehnartz*, Physiologische Chemie, Bd. 2/Teil 2c im Druck.

[6] *Landois-Rosemann*, Lehrbuch der Physiologie, 22. Aufl. Berlin, Wien: 1942.

[7] *F. Huber*, Naturwiss. **43**, 317 (1956).

[8] *H. L. Haller, F. Acree*, jr., und *S. F. Potts*, J. Amer. Chem. Soc. **66**, 1659 (1944).

[9] *A. Butenandt*, Naturwiss. Rdsch. **1955**, 457.

[10] *B. Flaschenträger* und *El Sayed Amin*, Nature **165**, 394 (1950). *El Sayed Amin*, M. Sc.-Thesis Alexandria 1949. Ph. D.-Thesis, Alexandria, 1951.

[11] *V. C. Dethier*, Chemical Insect Attractants and Repellents. London: Lewis. 1947.

Aus dem Biochemischen Institut der Medizinischen Fakultät und dem Chemischen Institut der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Alexandria/Ägypten

Kontinuierliche, fraktionierte Mikrosublimation im geteilten oder einfachen Sublimationsrohr*

Von

B. Flaschenträger, Samiha M. Abdel-Wahhab und **G. Habib Labib**

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 23. Januar 1957)

Für die Mikrosublimation wurde eine Reihe von Sublimationsapparaten beschrieben[1], jedoch keiner für fortlaufende fraktionierte Sublimationen. Seit Jahren haben wir solche Sublimationen ausgeführt und können zwei Verfahren empfehlen.

Das erste beruht auf der Verwendung eines durch Schliffe in vier oder mehr Teile geteilten Rohres aus Pyrexglas (Abb. 1), das in einen geeigneten,

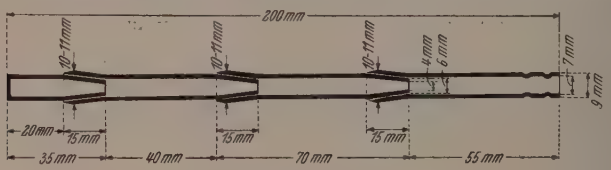


Abb. 1

mit Asbest umkleideten Kupfer- oder Aluminiumblock ähnlich dem von *F. Pregl*[2] angegebenen Trockenblock eingesetzt und entsprechend dem Fortgang der Sublimation im Block verschoben werden kann (Abb. 2).

In den Teil 1 des Rohres wägt man die „Substanz" ein. Der plan geschliffene Boden erleichtert das Wägen. Die Herstellung der Schliffe erfordert für die Sublimation im Hochvakuum Präzisionsarbeit. Zuerst

* Herrn Univ.-Prof. Dr. *Hans Lieb*, dem Mitbegründer der organischen Mikroanalyse, zum 70. Geburtstag in Dankbarkeit und mit besten Wünschen gewidmet.

schleift man mit Karborund, dann mit Bimsstein und schließlich allein mit Wasser und allein mit Luft. Weite und Länge der Schliffe sind so bemessen, daß das zusammengesetzte Rohr gut in die ausgesparte Rille des Heizblockes paßt und das innere Rohrlumen nicht zu eng wird*.

Teil 1 wird zunächst ganz und das Rohr 2 zur Hälfte waagerecht in den Heizblock eingesetzt. Der Rest des Rohres, der aus dem Ofen herausragt, wird mit einer Asbestplatte gegen Hitzestrahlung abgeschirmt und mit wassergetränkten Flanellappen gekühlt. In der zweiten Rille des Ofens liegt in der Höhe des Rohres 1 ein Thermometer. Die beiden freien Öffnungen des Ofens werden mit Asbestpfropfen verschlossen. Nachdem Hochvakuum erreicht ist, beginnt man langsam den Ofen anzuheizen und stellt das erste Auftreten eines Sublimats fest. Nach einiger Zeit schiebt man das ganze Rohr 2 tiefer in den Heizofen und treibt dadurch das Sublimat von hier nach Teil 3 usw., bis die Sublimate innerhalb bestimmter Temperaturbereiche getrennt sind.

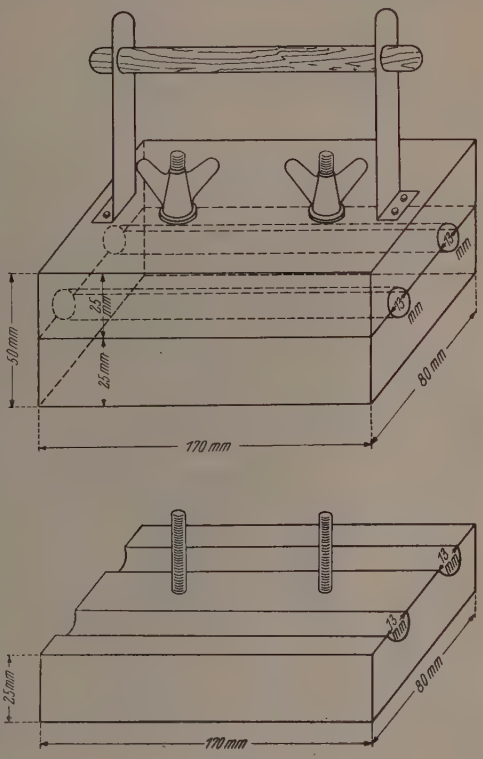


Abb. 2

Auf diese Weise gelingt es z. B., Säuren, wie Oxalsäure, Bernsteinsäure, Furandicarbonsäure und Kristallisate aus Harnextrakten, nahezu quantitativ zu trennen[3–6]. In Vorversuchen mit reinen Testsubstanzen kann man die Bereiche der Sublimationszeiten und -temperaturen bei gleichem Vakuum genau bestimmen. Die Sublimationstemperatur hängt

* Wir danken Herrn *Georg E. Fredericks*, Leiter des Scientific Instruments Centre in den Laboratorien des National Research Council of Egypt der Unesco Technical Assistance Mission in Cairo-Dokki, Ägypten, für seine stets hilfsbereite, ausgezeichnete fachmännische Beratung.

sehr von der Güte des Vakuums ab. Sind die Schliffe nicht ganz dicht, so treibt der eingesaugte Luftstrom das Sublimat zwar rascher vorwärts, aber es ist höhere Temperatur erforderlich.

Da uns die Herstellung hochvakuumdichter Schliffe nicht immer möglich war, kamen wir schließlich zu einer einfacheren Fraktionier-

Tabelle 1. Sublimationen mit geteilten Sublimationsrohren bei verschiedenem Vakuum

Säuren	Subst. mg	Subl. Temp. °C	mm Hg	Subl.-Zeit Min.	Ausbeute mg	Ausbeute %	Äquiv.-Gew. gef.	Äquiv.-Gew. ber.
Furandicarbonsäure	16,5	145	0,07	120	16,5	100	77,8	78,0
	18,5	150	0,11	180	17,9	97	80,0	78,0
	18,1	175	0,5	180	17,8	98,5	77,0	78,0
	16,4	175	1,0	180	0	0	76,8 Rückst.	
Oxalsäure + $2H_2O$	17,5	110	0,1	40	12,3*	98,5	—	—
Gemisch von Oxalsäure und Furandicarbonsäure	14,5	100—120	0,3	360	10,9* als Rückst.: 16,5	99	—	—
	16,5	100—120	0,3			100	79,3	78,0
Gemisch von Oxalsäure und Furandicarbonsäure	36,9	bis 103	0,5	120	26,0* als Rückst.: 17,9	98,5	—	—
	18,5	bis 103	0,5			97	80,1	78,0
Furandicarbonsäure	16,7	165	0,1	60	0		Rückst. 100%	—
Bernsteinsäure ...	24,6	165	1,0	75	24,0	97,5	—	—
Gemisch von Bernsteinsäure und Furandicarbonsäure....	18,9	165	1,0	75	18,8 als Rückst.: 16,9	100	—	—
	17,9	165	1,0			94,5	78,5	78,0

* Als wasserfreie Oxalsäure gewogen. Theoretische Ausbeuten: 12,5, 11,0, 26,4 mg.

methode, die sich ausgezeichnet bewährt hat. Ein gewöhnliches Weichglasrohr von 17 bis 20 cm Länge, 10 mm äußerem und 8 mm innerem Durchmesser wird zuerst im Heizblock bei den zu erwartenden Temperaturen im Hochvakuum der Länge nach „ausgeheizt". Dabei verlassen flüchtige Anteile der Glasoberfläche, meistens wohl Wasser, das Rohr. Nach Abkühlen des Rohres im Exiccator fügt man das zu sublimierende Material mit Hilfe eines langgestielten Einfüllröhrchens nach *Pregl*[2] ein

und wägt das Einfüllröhrchen zurück. Dann führt man die Sublimation wie im geteilten Schliffrohr aus. Im Vergleich damit erzielt man ein besseres Hochvakuum und eine niedrigere Sublimationstemperatur. Die einzelnen

Tabelle 2. Sublimationen[4] mit 17 cm langen Weichglasröhren bei 0,001 mm Hg

Säuren	Subst. mg	Subl.-Temp. °C	Subl.-Zeit Min.	Ausbeute		Äquiv.-Gew.	
				mg	%	gef.	ber.
Oxalsäure	2,9	45—55	40	2,85	98,5	45,1	45,0
Bernsteinsäure	15,48	60—80	210	15,45	100	59,1	59,0
Bernsteinsäure	17,15	60—80	240	17,18	100	59,5	59,0
Furandicarbonsäure .	12,52	120—170	240	12,52	100	78,4	78,0
Furandicarbonsäure .	9,385	125—170	180	9,38	100	78,5	78,0
Gemisch von Oxalsäure ohne H_2O,	9,2	45—55	240	9,18	99,7	45,5	45,0
Bernsteinsäure und Furandicarbonsäure	13,94 10,39	80—105 140—170	360 240	13,72 10,38	98,3 100	59,9 77,2	59,0 78,0
Hippursäure	6,61	85—105	240	6,61	100	180,6	179,2

Tabelle 3. Ergebnisse[5] unter obigen Bedingungen, aber bei 0,01 mm Hg

Säuren	Subst. mg	Subl.-Temp. °C	Subl.-Zeit Min.	Ausbeute		Äquiv.-Gew.	
				mg	%	gef.	ber.
Bernsteinsäure ...	7,923	60—96	60	7,875	99,4	59,03	59,04
Furandicarbonsäure.....	16,15	106—175	60	16,105	99,7	77,68	78,04
Gemisch von Bernsteinsäure und Furandicarbonsäure ...	15,50 16,00	bis 90 106—175	175 41	15,410 15,670	99,4 97,9	58,37 77,38	59,04 78,04
Gemisch von Bernsteinsäure und Furandicarbonsäure ...	10,929 18,56	60—90 106—175	170 15	9,739 17,342	98,1 93,4	58,91 78,08	59,04 78,04
Kristalle aus Harnextrakt I..	17,035	bis 90 106—155	60 150	0 14,206 Rückst.: 1,718	— 83,3 10,0	— 79,76 —	— 78,04 —
Kristalle aus Harnextrakt II.	23,00	bis 90 106—155	60 240	0 19,65 Rückst.: 3,15	0 85,4 13,6	79,81	78,04

Sublimate lassen sich leichter auf die Rohrlänge mit etwa 2 cm Zwischenraum verteilen. Zur weiteren Analyse der Sublimate zerlegt man das Rohr in einzelne Abschnitte durch Anritzen und Absprengen.

Bei vorsichtigem Arbeiten kann man das Rohr in die nötigen Teile zerlegen, ohne daß Glassplitter oder Wasser in die Rohrstücke eindringen. Die Bruchstücke werden entweder sofort oder nach Konstanttrocknen im Exiccator gewogen. Sublimierte Säuren werden im Erlenmeyerkolben (200 ml) mit überschüssigem 0,1-n Alkali gelöst und mit 0,1-n Säure zurücktitriert. Dann wird das jeweilige Rohrstück gewaschen, getrocknet und gewogen, um das Gewicht des Sublimates zu erhalten. Beim Auflösen und Titrieren darf man nicht stark schütteln, damit keine Glassplitter abgesprengt werden.

Man sieht aus Tabelle 1, daß die Sublimationstemperaturen sehr von der Güte des Vakuums abhängen. Bei einem Vakuum von 1 mm Hg sublimiert bei 165° noch keine Furandicarbonsäure, während die Bernsteinsäure quantitativ übergeht.

Tabelle 2 zeigt, daß bei einem Vakuum von 0,001 mm schon bei 45 bis 55° alle Oxalsäure, und bei 80 bis 105° alle Bernsteinsäure und Hippursäure wegsublimieren, so daß die Furandicarbonsäure bei 140 bis 170° ganz analysenrein abgetrennt werden kann.

Nach Tabelle 3 gehen schon bei 0,01 mm Hg die Bernsteinsäure bei 60 bis 90° und die Furandicarbonsäure bei 106 bis 175° in einer Stunde getrennt über.

Nach diesen Ergebnissen ist das einfache Sublimationsrohr einem nicht ganz hochvakuumdichten, geteilten Sublimationsrohr vorzuziehen.

Zusammenfassung

Zur fraktionierten Sublimation kleiner Mengen wird ein Glasrohr beschrieben, das durch vier hochvakuumdichte Schliffe in vier Teile zerlegbar ist, so daß die mit Hilfe eines Trockenblocks gewonnenen fraktionierten Sublimate sofort gewogen werden können. Sublimationen in einem ungeteilten Rohr zeigen, daß bei nachträglicher Zerlegung des Rohres ebenfalls gute Trennungen erreicht werden können.

Summary

A description is given of a glass tube for the fractional sublimation of small samples. The apparatus can be separated into four parts (joined by high vacuum ground joints) so that with the aid of a drying block the fractions can be weighed immediately. Equally good separations were accomplished by sublimations in a non-disconnected apparatus followed by separation of the tube into its parts.

Résumé

Description d'un tube de verre permettant d'effectuer des sublimations fractionnées sur de faibles quantités de matière. Grâce à quatre rodages

tenant aux vides élevés, le tube peut se démonter en quatre parties de sorte qu'à l'aide d'un bloc desséchant il est possible de peser immédiatement les différentes fractions de sublimat obtenues. Les sublimations effectuées sans partage montrent qu'il est également possible d'obtenir de bonnes séparations par démontage ultérieur du tube.

Literatur

[1] *H. Lieb* und *W. Schöniger*, Präparative Mikromethoden in der organischen Chemie, im Handbuch der mikrochemischen Methoden, herausgegeben von *F. Hecht* und *M. K. Zacherl*. Bd. I, Teil 1. Wien: Springer-Verlag. 1954. S. 71.

[2] *F. Pregl*, Die quantitative organische Mikroanalyse, 6. Aufl., neubearbeitet von Dr. *H. Roth*. Wien: Springer-Verlag. 1949. S. 97 und 122.

[3] *F. Meier*, Dissert. E. T. H. Zürich 1945.

[4] *Samiha Abdel-Wahhab*, Ph. D.-Thesis Alexandria 1953.

[5] *G. Habib Labib*, M. Sc.-Thesis Alexandria1953.

[6] *B. Flaschenträger*, *B. Cagianut* und *F. Meier*, Helv. Chim. Acta 28, 1489 (1945).

Laboratoire Municipal de la Ville de Paris, 39 bis, rue de Dantzig, Paris

Sur le microdosage des ions fluorures par alcalimétrie indirecte*

Par

Mlle **E. Debal, R. Lévy** et **H. Moureu**

Avec 1 figure

(Reçu le 1er février 1957)

L'objectif de l'étude que nous avons entreprise est le microdosage du fluor dans les composés organiques fluorés. Comme toute autre détermination élémentaire en analyse organique, ce dosage se divise en deux parties consécutives: la minéralisation de la substance organique et le dosage proprement dit du fluor sous la forme minérale obtenue. La présente communication est exclusivement consacrée à cette dernière partie dans l'hypothèse d'une minéralisation préalable par le sodium ou le potassium métalliques. Le problème est donc de titrer le fluorure dans la solution alcaline provenant de l'épuisement aqueux de la masse d'attaque.

Belcher[1] et *Kainz*[2] ont décrit des méthodes comportant la détermination thoriométrique des ions fluorures sur de telles solutions après attaque de la prise d'essai par le sodium en bombe de nickel[1] ou par le potassium en tube de verre scellé[2]. Malheureusement, la mise en œuvre des méthodes thoriométriques est très délicate. C'est ainsi qu'une récente étude statistique[3] a montré que des résultats obtenus dans dix laboratoires différents par des analystes expérimentés pouvaient présenter des écarts atteignant jusqu'à 20%.

Nous nous sommes proposés de rechercher une méthode spécifique du dosage des ions fluorures susceptible de remplacer la méthode thoriométrique sans en présenter les inconvénients. Le principe qui a été retenu a déjà été appliqué à l'échelle macroanalytique par *Ryss* et *Beszmenova*[4]. Ces auteurs dosent les ions F^{2-} en mesurant la variation d'acidité d'une solution acide de fluorure lorsqu'on la fait réagir sur la silice en présence

* Travail publié en l'honneur du 70ème anniversaire de Monsieur le professeur Dr. *Hans Lieb*.

d'un sel de potassium. La stoechiométrie globale de la réaction peut être schématisée par l'équation d'équilibre:

$$SiO_2 + 6\,F^- + 4\,H^+ + 2\,K^+ \rightleftharpoons SiF_6K_2 + 2\,H_2O \qquad (1)$$

Le fluosilicate SiF_6K_2 précipite de sorte que cet équilibre est déplacé vers la droite; pratiquement la présence de 6 ions F^- se traduit effectivement par la disparition de 4 ions H^+ de la solution.

A l'échelle microanalytique, en milieu dilué et en l'absence d'ions K^+, il n'existe pratiquement que de l'acide fluorhydrique en solution, à tel point qu'il est possible de doser cet acide par simple alcalimétrie, même en présence de silice[5].

Si par contre, à une solution type de fluorure de sodium contenant en suspension de la silice, on ajoute, après neutralisation, un excès d'un volume déterminé d'un acide titré et du chlorure de potassium, on constate, en dosant en retour l'acidité de la solution, que celle-ci a effectivement diminué. Il est intéressant de remarquer que, dans le domaine microanalytique, cette disparition d'ions H^+ n'est accompagnée d'aucune précipitation apparente, même si la solution est quasi saturée en chlorure de potassium.

En supposant l'existence des mêmes ions dans la solution, on peut penser qu'ils sont en équilibre d'après l'équation:

$$SiO_2 + 6\,F^- + 4\,H^+ \overset{\text{(excès d'ions } K^+)}{\rightleftharpoons} SiF_6^{2-} + 2\,H_2O. \qquad (2)$$

En fait, le dosage en retour des ions H^+ subsistant dans la solution, exige de respecter des conditions bien définies. On doit tout d'abord choisir un indicateur coloré virant à un p_H suffisamment faible pour que l'addition du réactif alcalin titrant (soude 0,01 N) ne tende pas, en faisant disparaître tous les ions H^+ de la solution, à faire rétrograder vers la gauche l'équilibre global représenté par l'équation 2. Pour des concentrations ioniques dont les limites seront précisées ultérieurement nous avons constaté que les meilleurs résultats étaient obtenus avec l'indicateur mixte rouge de méthyle-vert de bromocresol[6] qui au voisinage de $p_H = 5$, vire du rose en milieu acide au vert en milieu basique en passant par le violet et le gris.

L'expérience montre cependant qu'un tel virage n'est pas stable; pour rendre le titrage en retour suffisamment précis, il est en outre nécessaire de refroidir la solution dans la glace à 0° et de lui ajouter une proportion d'éthanol comprise entre 25 et 50%. Dans ces conditions, la couleur de la solution a encore tendance à rétrograder du gris vert (teinte adoptée pour le virage final) au violet, quelques secondes après le virage, mais une à deux gouttes de solution de soude 0,01 N suffisent alors pour rétablir la couleur initiale, même après dix minutes d'attente. Fort heureusement, le virage très progressif de l'indicateur coloré prévient

l 'opérateur de l'appproche de la fin du titrage, de sorte qu'il est possible d'apprécier le point final très nettement et sans hésitation, si l'on prend la précaution d'introduire rapidement les derniers centièmes de ml de réactif titrant.

La forme sous laquelle doit être employée la silice pour qu'elle réagisse aussi rapidement que possible sur les ions fluorures en milieu acide n'est pas indifférente: les résultats les plus satisfaisants ont été obtenus avec une «solution» préparée le jour même de son utilisation en dissolvant dans l'eau distillée du silicate de sodium pur fondu du commerce et en acidifiant ensuite par l'acide chlorhydrique.

Deux facteurs principaux restent encore susceptibles de perturber les titrages: la présence d'anhydride carbonique dans la solution à titrer et, du fait de l'attaque des béchers de titrage, la possibilité d'introduction d'anions complexant les ions fluorures.

L'anhydride carbonique est aisément éliminé par agitation de la solution froide et légèrement acide (coloration violet rose de l'indicateur mixte) avant sa première neutralisation. Ce résultat pourrait être obtenu plus rapidement si la solution était portée à l'ébullition, mais, quoi qu'en disent certains auteurs, ce mode opératoire est susceptible de donner lieu à des pertes de fluor. L'introduction d'ions étrangers dans la solution à titrer (en particulier des ions boriques) est évitée d'autre part par l'emploi exclusif de matériel de silice fondue transparente (béchers et agitateurs).

Le respect de toutes les conditions du titrage en retour qui viennent d'être définies ne permet pas, cependant, d'obtenir les résultats prévus par la stoechiométrie de la réaction 2. Lorsqu'on effectue le calcul des quantités de fluor correspondant aux ions hydrogènes disparus à raison de 1 H^+ pour 1,5 F^- à partir de déterminations effectuées sur des solutions types de fluorure de sodium, on constate qu'elles sont déficitaires. On observe toutefois que, pour des conditions opératoires identiques, les écarts entre les résultats analytiques et les quantités réelles sont reproductibles. En particulier, si à la «solution» neutralisée de fluorure et de silice, on ajoute un volume constant d'acide titré (u ml de biiodate de potassium 0,01 N) en excès par rapport aux ions fluorures à doser, l'écart ε (exprimé en volume de réactif 0,01 N) ne dépend que de la quantité de fluor présente en solution et du volume final de cette solution* ou, ce qui revient sensiblement au même, du volume v de soude consommé lors du titrage en retour des ions hydrogènes en excès et du volume

* Il est intéressant de remarquer que l'écart ε est indépendant de la concentration de la solution en ions K^+ si celle-ci est supérieure à une limite inférieure définie. Le volume d'éthanol peut également varier entre de larges limites sans influencer la valeur de cet écart si le volume de la solution *purement aqueuse* reste constant.

initial V_0 de la solution avant titrage. En définitive, la quantité réelle d'ions hydrogènes disparus de la solution est équivalente à $(u - v + \varepsilon)$ ml de réactif titrant 0,01 N.

Il en résulte que si l'on a pu établir empiriquement les valeurs numériques de la relation fonctionnelle $\varepsilon = f(v, V_0)$ dans une étude expérimentale préalable, il devient possible d'effectuer le titrage d'une solution inconnue d'ions fluorures en utilisant les valeurs numériques de ε pour corriger les résultats analytiques bruts. Ces valeurs numériques de ε en fonction de v et de V_0 sont fournies par le réseau de courbes de la figure 1.

Réactifs

Solution de biiodate de potassium 0,01 N, d'après *Niederl* et *Niederl*[7], en burette de microanalyse.

Solutions de soude décarbonatée 0,01 N et 0,1 N, d'après *Niederl* et *Niederl*[7]. en burette de microanalyse (solution 0,01 N) ou en ultramicroburette (0,1 N).

Solution d'acide chlorhydrique, approximativement 0,1 N.

Solution de fluorure de sodium 0,01 M: peser la quantité exacte de fluorure de sodium cristallisé pur P. A. anhydre correspondant à 1 l de solution; dissoudre, en fiole jaugée de 1 l, dans l'eau bidistillée et ajuster à un litre selon la technique classique.

Indicateur mixte: mélanger une partie d'une solution alcoolique de rouge de méthyle à 0,1% et 2 parties d'une solution alcoolique de vert de bromocrésol à 0,05%.

Chlorure de potassium: purifier, par deux cristallisations successives dans l'eau distillée, le produit „pur pour analyse" du commerce et le sécher à l'étuve à 100—120° jusqu'à poids constant. Ce nombre de cristallisations est en général suffisant pour que le chlorure de potassium ait une «acidité» constante et reproductible par unité de masse.

L'acidité du chlorure de potassium est déterminée de la façon suivante: neutraliser 40 ml d'eau distillée additionnée de 0,2 ml d'indicateur mixte, de façon à obtenir avec précision la coloration gris vert; y dissoudre 10 g de chlorure de potassium et, tout en agitant, attendre dix minutes que la solution soit revenue à la température ambiante. Ajouter de la soude 0,01 N par petites fractions jusqu'à virage gris vert persistant pendant quelques secondes.

Le volume de soude consommé peut atteindre 0,15 à 0,30 ml pour un chlorure pur P. A. non recristallisé, il s'abaisse à 0,03—0,08 ml après la première cristallisation et se stabilise en général à 0,03—0,06 ml dès la seconde cristallisation.

«Solution de silice»: Cette solution doit être préparée le jour même de son utilisation. Si l'on prévoit n dosages dans la journée, peser, au milligramme près, $8n$ milligrammes de silicate des odium pur fondu

(Prolabo n° 28089), introduire cette masse dans un bécher de silice, y ajouter $3n$ ml d'eau distillée et 0,2 ml de solution d'indicateur mixte. Porter à l'ébullition quelques minutes pour dissoudre le silicate et ajouter goutte à goutte une solution d'acide chlorhydrique approximativement 0,1 N jusqu'à coloration rose persistant quelques secondes à l'ébullition. Eliminer les quelques particules d'insoluble par filtration sur papier de la solution fraîchement préparée. Neutraliser grossièrement le filtrat. Diluer au volume $V = 3n$ avec de l'eau distillée, agiter quelques secondes et ajouter un excès d'acide titrant 0,01 N (biiodate de potassium) de l'ordre de grandeur de 0,10 ml.

Pour chaque dosage, prélever 3 ml de cette «solution de silice» à l'aide d'une éprouvette graduée en dixièmes de ml.

Ethanol à 97° redistillé.

Matériel

Bécher de silice transparente de 140 ml.

Barreaux d'agitateurs magnétiques (pointes de fer doux enrobées dans des petits tubes de silice transparente scellés aux deux extrémités).

Agitateur magnétique.

Burettes de microanalyse:* Capacité 10 ml, graduation 0,02 ml[8].

ou *Ultramicroburette de Gilmont*:* Capacité 1 ml, graduation 0,001 ml (E. Greiner Constructeur, USA).

Eprouvettes graduées 10 ml au $^1/_{10}$ ml, 100 ml au $^1/_2$ ml.

Pipette de précision de 10 ml.

Tube fluorescent blanc pour l'observation des virages.

Mode opératoire

Transvaser la solution de fluorure contenant de 0,35 à 2,5 mg de fluor dans un bécher de silice transparente contenant un barreau d'agitateur magnétique enrobé de silice.

Ajuster le volume de cette prise d'essai à environ 22 ml.

Ajouter 3 ml de la «solution de silice» préparée le jour même, 16 ml d'éthanol mesurés dans une éprouvette graduée en $^1/_2$ ml et 0,2 ml de solution d'indicateur mixte. Faire virer l'indicateur au violet gris à l'aide de réactif titrant 0,01 N (soude ou biiodate de potassium) que l'on ajoute par fraction de 0,02—0,03 ml. Agiter énergiquement une dizaine de minutes et laisser reposer pendant le même temps** afin que la solution revienne à la température ambiante***.

---

* On emploie indifféremment les burettes de microanalyse ou les ultramicroburettes, avec des réactifs titrants qui sont 0,01 N dans le premier cas et 0,1 N dans le second.

** Une attente pouvant atteindre 2 heures ne présente aucun inconvénient.

*** L'addition d'alcool et le séjour sur l'agitateur magnétique provoquent, en effet, une légère augmentation de température.

Neutraliser au gris vert à l'aide de soude 0,01 N lentement introduite par fraction de 0,01 à 0,02 ml, sous agitation magnétique, et en déterminant le virage par observation verticale, à travers la solution, d'un rond de papier blanc placé sous le bécher, à la lumière d'un tube fluorescent blanc. Le virage est d'autant plus net que la solution contient moins de fluor. Introduire, dans la solution neutre, 10 ml de la solution d'acide 0,01 N (biiodate de potassium) à l'aide d'une pipette de précision, puis 3 g pesés au trébuchet de chlorure de potassium recristallisé. Agiter pour dissoudre le sel et maintenir dans la glace fondante pendant 2 heures sous agitation; la température de la solution doit se fixer entre 0 et 3° C. Doser l'acidité restante en retour avec de la soude 0,01 N délivrée par une burette de microanalyse ou de la soude 0,1 N délivrée par une ultramicroburette*, sans sortir le bécher de la glace et en agitant énergiquement. L'approche du virage final est signalé par variation de la coloration de la solution du rose au violet. Suspendre alors l'addition de soude quelques secondes pour obtenir un mélange bien homogène, puis ajouter rapidement les derniers centièmes de ml de soude jusqu'à apparition d'une coloration gris-vert dans toute la masse du liquide et lire le volume de soude consommé. La température finale de la solution doit être alors de 2—3° C.

Mesurer le volume final V_f de la solution après titrage par transvasement dans l'éprouvette graduée au $^1/_2$ ml. En déduire le volume initial V_0 avant titrage:

$$V_0 = V_f - \text{volume de soude consommé.}$$

Pour faciliter les calculs ultérieurs, exprimer le volume de soude consommé en réactif exactement 0,01 N; soit v ce volume.

Calculs

La connaissance des volumes v et V_0 permet de déterminer la correction ε ml sur le réseau de courbes de la figure 1. La masse de fluor m dosée dans la solution analysée se calcule alors d'après la formule:

$$m = 0{,}19 \cdot 1{,}5\,(10 - v + \varepsilon) = 0{,}285\,(10 - v + \varepsilon)\ \text{mg}.$$

Cette formule n'est valable que pour des quantités de fluor comprises entre 0,4 et 2,5 mg. La limite inférieure de 0,4 mg peut toutefois être abaissée au voisinage de zéro si l'on ajoute à la solution, avant titrage, un volume de solution type de fluorure de sodium 0,01 N au moins équivalent à 0,4 mg de fluor que l'on le retranche ensuite de la quantité globale de fluor dosée.

Discussion

Les valeurs de la correction ε ont été déterminées expérimentalement par «dosage» du fluor sur des solutions types réalisées avec la solution de fluorure de sodium 0,01 N. Ce dosage est effectué suivant le mode

* La pointe de l'ultramicroburette est immergée dans la solution à titrer.

opératoire décrit dans le paragraphe précédent. Si l'une de ces solutions contient w ml de fluorure de sodium 0,01 N et si v ml représente le volume de soude 0,01 N consommé en retour, il vient:

$$w = 1{,}5\ (10 - v + \varepsilon) \text{ soit:}$$

$$\varepsilon = \frac{2}{3} w + v - 10$$

Plus de 300 essais ont été effectués afin de déterminer les valeurs numériques de ε pour des valeurs de w, variant de 2 à 15 ml et des valeurs du volume initial de la solution variant de 45 à 61 ml.

En deçà de $w = 2$ ml, il n'est pas possible d'obtenir des valeurs expérimentales reproductibles de v. Au delà de $w = 15$ ml, la quantité d'ions F^- en solution devient supérieure à la quantité d'ions H^+ disponibles pour permettre la réaction (2) (10 ml d'acide 0,01 N).

Les valeurs numériques trouvées pour ε ont permis de tracer le réseau des courbes de la figure 1.

On remarquera que ε croît rapidement pour les faibles valeurs du retour de soude v (teneurs en fluor élevées), ce qui rend sa détermination peu précise sur le graphique, toutes autres conditions étant égales d'ailleurs. Il en résulte qu'il n'est pas recommandable d'effectuer des dosages d'ions F^- dans cette zone qui correspond d'ailleurs à des quantités de fluor sensiblement comprises entre 2,5 et 2,8 mg. Pour la même raison, on évite de travailler sur des solutions dont les volumes initiaux sont supérieurs à 53 ml (zone des courbes en traits interrompus) surtout pour les valeurs élevées du retour de soude v (faibles quantités de fluor). Dans ces conditions, la masse de fluor dosée étant comprise entre 0,4 et 2,5 mg et le volume initial de la solution entre 45 et 53 ml, l'écart type σ_F (déviation standard) du titrage est sensiblement constant et égal à 6—7 μg de fluor. Cette valeur de σ_F est relativement élevée; elle se compare toutefois de façon favorable aux écarts types des titrages thoriométriques effectués sur des solutions types.

C'est ainsi que, d'après nos propres essais, l'écart-type de la méthode de *Kainz*[2] est de 10 –12 μg de fluor, tandis que, pour la méthode de *Belcher*[1] (qui comporte un titrage sur un prélèvement aliquote de $^1/_5$), il croît rapidement au delà de 6 à 10 μg de fluor rapportés à la solution initiale, lorsque celle-ci contient plus de 0,25 à 0,60 mg de cet élément (0,05 à 0,12 mg dans le prélèvement aliquote).

Il convient finalement de remarquer que la méthode de dosage des fluorures par alcalimétrie indirecte est perturbée par la présence de nombreux ions étrangers; cette difficulté oblige à proscrire la mise en œuvre d'une minéralisation préalable en tubes de verre scellés (Iena ou Pyrex); ceux-ci doivent être remplacés par des tubes de silice transparente; quant à la présence de nickel (sous forme d'ions Ni^{++}) pouvant éven-

tuellement provenir d'une bombe d'attaque, sa présence dans la solution à titrer ne semble pas donner lieu à des résultats de dosages erronés pour des quantités inférieures ou égales à 0,6 mg; un léger déficit en fluor apparaît lorsque ces quantités sont de l'ordre de grandeur de 2 mg.

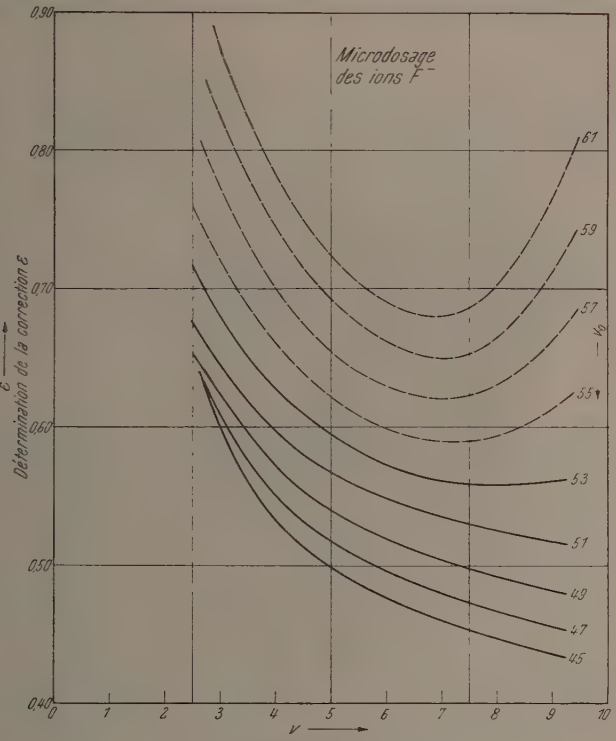


Figure 1. Détermination de $\varepsilon = f(v, V_0)$

Résumé

Les auteurs ont mis au point une méthode spécifique de microdosage titrimétrique des ions F^- susceptible d'être associée à une minéralisation préalable d'un échantillon de substance organique fluorée en vue d'y doser le fluor, à l'échelle microanalytique.

Le principe en est fondé sur la réaction globale probable:

$$6\,F^- + 4\,H^+ + SiO_2 + n\,K^+ \longrightarrow SiF_6^{2-} + 2\,H_2O + n\,K^+,$$

qui donne lieu à la disparition de 4 ions H^+ du milieu réactionnel pour 6 ions F^- initialement présents. Cette consommation d'ions hydrogènes est mesurée par alcalimétrie et permet ainsi de doser le fluor. La réaction

précédente ne se produit qu'en milieu acide, et en présence d'ions K^+ sans précipitation apparente de fluosilicate de potassium.

Le résultat brut du dosage doit subir une correction additive fonction de la teneur apparente correspondante en fluor et du volume de la solution et dont la valeur peut être déterminée à l'aide d'un diagramme établi expérimentalement.

Zusammenfassung

Eine neue spezifische Methode zur Mikrobestimmung von Fluoridionen wird angegeben. Diese eignet sich für organische fluorhältige Substanzen nach deren Mineralisierung. Sie beruht auf der wahrscheinlichen Reaktion:

$$6\,F^- + 4\,H^+ + SiO_2 + n\,K^+ \rightarrow SiF_6^{2-} + 2\,H_2O + n\,K^+,$$

wonach für je 6 Fluoridionen 4 Wasserstoffionen gebunden werden. Dieser Verbrauch an H-Ionen wird alkalimetrisch gemessen und bietet damit die Grundlage zur Fluorbestimmung. Diese erwähnte Reaktion findet nur in saurem Milieu bei Gegenwart von Kaliumionen statt, ohne daß es zu einer erkennbaren Ausscheidung von Kaliumsilicofluorid kommt. Dem Bruttoergebnis der Bestimmung ist eine Korrektur zuzuzählen, die von dem jeweiligen scheinbaren Fluorgehalt und dem Lösungsmittelvolumen abhängig ist und deren Größe sich aus einem experimentell ermittelten Diagramm ergibt.

Summary

A specific micro determination is given for the titrimetric determination of fluoride ions that is susceptible of being associated with a preliminary mineralization of a sample of a fluorine-bearing organic compound with a view of determining in it the fluorine on the micro scale. The fundamental principle is the probable total reaction:

$$6\,F^- + 4\,H^+ + SiO_2 + n\,K^+ \rightarrow SiF_6^{6-2} + 2\,H_2O + n\,K^+$$

which leads to the disappearance of 4 H^+ ions from the reaction milieu for each 6 F^- ions originally present. This consumption of ions is measured alkalimetrically and the fluorine content can be calculated accordingly. The above reaction occurs only in an acid medium and in the presence of K^+ ions without apparent precipitation of potassium fluosilicate. The gross result of the determination must be corrected by an additive function of the apparent content corresponding to the fluorine present and to the volume of the solution. The value of this correction factor may be determined with the aid of a diagram which has been constructed on the basis of trials set up for this purpose.

Bibliographie

[1] *R. Belcher, E. F. Caldas, S. V. Clark* et *A. MacDonald*, Mikrochim. Acta [Wien] **1953**, 283.

[2] *G. Kainz* et *F. Schöller*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 843.

[3] *L. J. Hardin*, J. Assoc. Off. Agric. Chemists **36**, 237 (1953).

[4] *I. G. Ryss* et *P. Beszmenova*, Zav. Lab. **4**, 163 (1935).

[5] *H. S. Clark*, Analyt. Chemistry **23**, 659 (1951).

[6] *I. M. Kolthoff*, Säure-Base-Indikatoren. Berlin 1932.

[7] *J. B. Niederl* et *V. Niederl*, Micromethods of Quantitative Organic Analysis, 2e ed. New York: Wiley. 1946. p. 53, 56.

[8] *F. Pregl*, Quantitative organische Mikroanalyse, 6. Aufl., neubearbeitet von Dr. *H. Roth*. Wien: Springer-Verlag. 1949. p. 192.

Laboratoire de Chimie Minérale, de Chimie Analytique et de Microchimie de l'Université Genève (Suisse)

Etude du microdosage de la tyrosine*

Par

P. E. Wenger, D. Monnier et **J. Vogel**

Avec 2 figures

(Reçu le 1er février 1957)

1. Introduction

Le microdosage de la tyrosine par nitration et réduction polarographique, qui fait l'objet du présent travail, met à profit le fait que les dérivés nitrés de substances organiques donnent par réduction une vague polarographique particulièrement nette et reproductible. D'autre part, la tyrosine présente la propriété de se nitrer avec une très grande facilité. Partant de travaux effectués dans nos laboratoires[1–3], nous avons poursuivi la mise au point de cette méthode de dosage simple et rapide et ne nécessitant, en dehors du polarographe lui-même, qu'un matériel extrêmement réduit. Les produits de nitration étant tout à fait stables avec le temps, il est possible, si l'on ne dispose pas en permanence d'un polarographe, de les conserver pour les doser à un moment quelconque.

Les dosages de la tyrosine se fait actuellement suivant des méthodes principalement chromatographiques et colorimétriques. Nous citerons parmi les travaux récents les recherches se basant sur l'emploi de la ninhydrine[4–6]; de 1-nitroso-2-naphtol[7–9]; du sel de Cd de la dioxohydrindylidènehydrindamine[10]. La colorimétrie est très souvent précédée d'une séparation chromatographique[11,12].

On utilise également les colonnes à échangeurs d'ions[13] et l'étude spectrophotométrique de l'absorption dans l'ultraviolet de dérivés des amino-acides[14].

La précision de ces méthodes varie en général entre $\pm$ 3% et $\pm$ 10% sur des prises de 5 à 200 μg.

* A Monsieur le professeur Dr. *Hans Lieb* à l'occasion de son 70ème anniversaire.

Les autres procédés nécessitent des techniques et un matériel spécial.

Au cours du présent travail, nous exposerons tout d'abord la mise au point de la méthode qui a été faite en macrodosage. La transposition en microdosage est exposée ensuite; il s'agit d'une simple modification de l'appareillage, la marche de l'analyse elle-même restant inchangée.

2. Matériel, appareillage et mode opératoire

Les réactifs utilisés sont les suivants:

1. Acide nitrique Merck à 65% (D = 1,4)
2. Tyrosine Merck
3. Hydroxyde de potassium puriss. Merck
4. Solution tampon pH 5: 51,5 ml de Na_2HPO_4 0,2-mol. 48,5 ml d'acide citrique 0,1-mol. (Produits Merck.)

Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau bidistillée.

Appareillage:

1. Les essais polarographiques ont été effectués avec l'appareil Radiomètre PO3e et l'appareil Sargent modèle XXI.

Temps de gouttes: 2,91 secondes.

2. Erlenmeyers de 100 ml en pyrex, rodés, avec réfrigérants à reflux. Chauffage normal sur toile métallique.

Mode opératoire:

Les essais ont montré que la tyrosine peut être nitrée de manière très correcte en utilisant de l'acide nitrique 0,15-n, que la réaction est entièrement terminée après 2 heures d'ébullition et enfin que les vagues polarographiques sont les meilleures (netteté et facilité de mesure) au pH 5.

En conséquence, nous avons établi les conditions de travail suivantes qui donnent entière satisfaction:

1. On effectue une prise de tyrosine comprise entre 5 et 40 mg que l'on introduit dans un Erlenmeyer en pyrex de 100 ml. On ajoute 40 ml d'acide nitrique 0,15-n.

2. On chauffe à l'ébullition à reflux pendant 2 heures à partir de l'apparition de la coloration jaune (ce qui se produit généralement juste avant l'ébullition).

3. On refroidit sous l'eau courante et on neutralise par une solution d'hydroxyde de potassium à 20%. La coloration devient plus foncée et tend à virer au jaune-orange. On transvase dans un flacon jaugé de 50 ml, et on complète par de l'eau bidistillée.

4. La solution précédemment aptenue permet d'effectuer les polorogrammes à diverses concentrations. On prélève par exemple 5 ml de cette solution, que l'on introduit dans un flacon jaugé de 10 ml, on ajoute 2 ml de solution tampon pH 5 et l'on complète par de l'eau bidistillée.

5. La solution tamponnée étant placée dans une cuve à polarographier, on chasse l'oxygène par un courant d'azote purifié. On polarographie ensuite à la sensibilité convenable.

3. Courbe d'étalonnage

En procédant comme il vient d'être dit, nous avons établi une courbe d'étalonnage au moyen du polarographe Radiomètre, Type PO3e; les valeurs obtenues ont été les suivantes: (voir fig. 1).

Prise (g)	Concentration (mg/l)	Hauteur Saut. (μA)	Tyrosine trouvée	K (mg/l μA)
0,01805	72,2	6,02	0,0179	12,0
0,01805	108,3	8,82	0,0179	12,29
0,01805	144,4	11,57	0,0184	12,48
0,01805	180,5	14,42	0,01795	12,52
0,01805	216,5	17,22	0,0179	12,57
0,0180	72,0	6,28	0,0186	11,46
0,0180	144,0	11,73	0,01805	12,28
0,0180	216,0	17,48	0,01815	12,35
0,0136	108,7	9,02	0,01375	12,05
0,0225	180,0	14,59	0,0227	12,34
0,0202	40,4	3,53	0,0205	11,45
0,0202	80,8	6,74	0,0203	12,0

Réglage de l'appareil:

Sensibilité 700, Damping 5, hauteur de mercure 34 cm.

La qualité des sauts est très satisfaisante et la hauteur en est très facilement mesurable. Les mesures de hauteur sont faites par la méthode du quadrilatère selon « Sargent ».

Les valeurs de K nous montrent que, dans l'intervalle des concentrations utilisées, la hauteur du saut est une fonction linéaire rigoureuse de la teneur en tyrosine de la solution.

4. Elimination des influences perturbatrices

Les composés organiques renfermant des groupements — SH empêchent la nitration de la tyrosine. Ceci est particulièrement visible lorsqu'on étudie le cas de la cystéine.

Il est impossible de nitrer la tyrosine en présence de cystéine même si sa quantité relative est faible. L'adjonction de nitrite de sodium à la solution est sans effet.

La cystine par contre n'est pas gênante, le groupement —S— (pont de soufre) ne perturbe donc pas la nitration.

Il apparait que, d'une manière générale, c'est le radical — SH comportant un hydrogène libre qu'il s'agit d'éliminer.

Ce problème est très important car la cystéine notamment est souvent présente dans les mélanges d'amino-acides.

Nous savons que l'hydrogène du groupement —SH est facilement remplaçable par un métal; on obtient ainsi très souvent un produit insoluble. Dans notre cas particulier, l'excès de réactif de précipitation ne doit pas donner un saut dans la région comprise entre —0,4 et —0,8 volts.

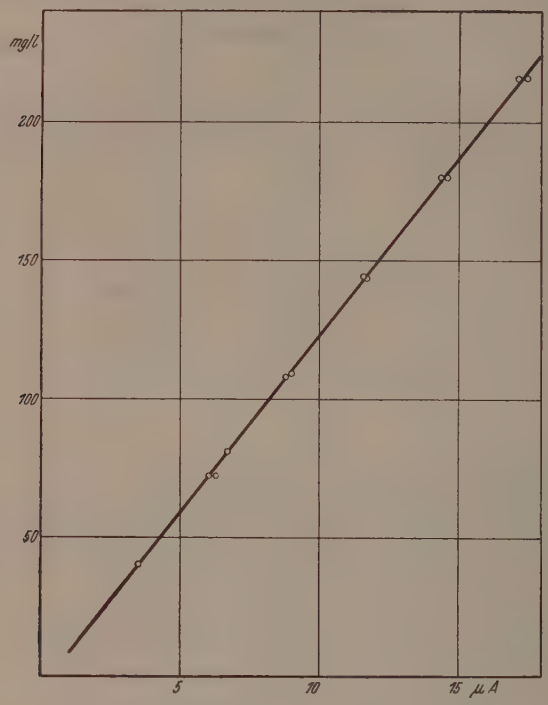


Fig. 1

L'utilisation de divers métaux a été envisagée, mais il fallait qu'ils s'adaptent à nos conditions de travail. Après quelques essais, nous avons finalement porté notre choix sur le mercure que nous utilisons sous forme d'acétate mercurique.

Il se trouve que le mercure bivalent convient très bien au but que nous proposons, nous utilisons donc une solution d'acétate de mercure dans l'acide nitrique 0,15-n (ceci pour que l'adjonction du réactif ne modifie pas la concentration en acide de la solution). Nous pouvons constater en effet que:

a) La cystéine donne, en présence de Hg^{2+} un précipité blanc immédiat et quantitatif.

b) Une solution de tyrosine traitée par Hg^{2+} reste absolument limpide à froid comme à chaud. Sa nitration donne un saut polarographique de hauteur normale.

c) Dans les conditions où nous travaillons, les cations Hg^{2+} en excès dans la solution, après précipitation des substances gênantes, ne perturbent pas le tracé de la courbe polarographique.

Essais quantitatifs:

Le réactif de précipitation est constitué de 1 g d'acétate mercurique dissous dans 50 ml d'NO_3H 0,15-n. Il faut 1 ml de cette solution pour précipiter théoriquement 0,0152 g de cystéine.

On assure un excès de réactif de $^1/_3$ environ.

La marche de l'analyse est identique à celle qui est indiquée plus haut. L'élimination du précipité se fait par centrifugation; il suffit de prélever dans le tube à centrifuger une partie aliquote au moyen d'une pipette.

Les résultats suivants ont été enregistrés:

Prise (g)		Conc. Tyr. (mg/l)	Tyrosine trouvée	Saut. (μA)	K (mg/l μA)
Tyrosine	Cystéine				
0,0201	0,0203	120,6	0,01985	9,75	12,37
0,0209	0,0221	41,75	0,0205	3,53	11,83
0,0212	0,0214	42,4	0,0210	3,63	11,70
0,0212	0,0214	83,6	0,0206	6,74	12,40
0,0212	0,0214	84,8	0,0211	7,05	12,04
0,0212	0,0214	127,3	0,0216	10,58	12,04

Ces résultats montrent que la méthode d'élimination est pleinement satisfaisante. La tyrosine étant peu soluble en milieu neutre, il est préférable d'effectuer la précipitation directement dans le milieu acide qui sera utilisé pour la nitration, ce qui simplifie les opérations et évite toute perte (v. mode opératoire p. 410).

5. Dosage de la tyrosine en présence de tryptophane

Parmi les amino-acides que l'on rencontre dans les hydrolysats protéiniques courants susceptibles de se nitrer par ébullition en présence de NO_3H dilué, le tryptophane est un des rares qui apporte des perturbations à notre méthode de dosage.

Le tryptophane seul n'est pas touché par l'acide nitrique 0,15-n, même après plusieurs heures d'ébullition à reflux, mais sa présence empêche une nitration correcte de la tyrosine quelles que soient les conditions dans lesquelles on travaille. Son élimination est donc rendue nécessaire.

Le tryptophane donne en présence de Hg^{2+} un précipité très peu soluble. La réaction est assez lente mais on peut l'accélérer beaucoup par chauffage.

Il est donc possible d'éliminer d'une manière très simple et simultanément le tryptophane et les produits organiques renfermant des groupements —SH.

Lorsque l'on dose la tyrosine en présence de tryptophane en grand excès (rapport 5 à 100 par exemple), on trouve souvent une valeur trop faible pour la tyrosine. Nous avons montré que ceci était dû à une adsorption partielle de la tyrosine lors de la précipitation du tryptophane par le mercure. Pour l'éviter, nous avons introduit de la phénylalanine dans la solution. Cette substance ayant une constitution chimique presque analogue à celle de la tyrosine (au radical —OH près) il était permis de penser qu'elle se laisse adsorber au moins aussi facilement que la tyrosine. C'est bien ce qui se produit car, en effet, en présence de phénylalanine, les dosages redeviennent exacts dans les limites d'erreurs admises.

L'expérience suivante a été faite pour étudier l'influence de la phénylalanine lors d'un dosage de la tyrosine en présence de tryptophane dans le rapport $\frac{\text{Tyrosine}}{\text{Tryptophane}} = \frac{1}{10}$ environ.

A des prises identiques de ces deux substances, des quantités croissantes de phénylalanine ont été ajoutées. La hauteur des sauts polarographiques due à la tyrosine, trop faible au début, devient constante à moins de 1% près, lorsque le rapport phénylalanine, Barre de fraction, tryptophane, devient supérieur à environ 6/8ème en poids (ce qui correspond au rapport moléculaire 1/1).

Des essais de déplacement de la tyrosine déjà adsorbée ont également été faits. Les polarogrammes ont montré que la solution recevant après précipitation du tryptophane une adjonction de phénylalanine suivie d'agitation et de chauffage donne un saut de 7 à 10% plus élevé que celui de la solution témoin. Il y a donc échange. La phénylalanine vient prendre la place de la tyrosine — ce qui prouve que cette dernière est moins facilement adsorbée que la phénylalanine.

Pour améliorer la précision des dosages et se rendre indépendant de l'appareillage, il est avantageux de procéder par étalonnage interne.

Mode opératoire pour le dosage de la tyrosine en présence de tryptophane et de dérivés sulfurés

1. Dissoudre la prise contenant environ 10 à 30 mg de tyrosine dans 30 ml d'acide nitrique 0,15-n.

On ajoute à la prise au moins 6/8ème du poids de tryptophane en phénylalanine solide; nous avons pu constater que la présence de phénylalanine évite le risque d'adsorbtion de la tyrosine par la précipitation du composé du tryptophane avec le mercure.

Chauffer à 50—60° pour faciliter la mise en solution.

2. Ajouter une quantité de solution de mercure telle que l'on obtienne immédiatement un trouble opaque.

Chauffer à nouveau à environ 60°, puis laisser reposer une à deux heures.

3. Transvaser le tout dans un cylindre gradué et compléter à un chiffre exact par NO_3H 0,15-n.

(On peut également utiliser un flacon jaugé de 50 ml.)

On place ensuite la suspension dans un tube et on centrifuge pendant 10 minutes à grande vitesse.

On décante ensuite et on prélève une partie aliquote à l'aide d'une pipette.

4. La prise aliquote est introduite dans un Erlenmeyer rodé de 100 ml. On porte à 40 ml par NO_3H 0,15-n et l'on fait bouillir à reflux durant deux heures.

5. On refroidit sous l'eau courante, on neutralise par KOH à 20% et on complète à 50 ml dans un flacon jaugé.

6. On prélève 7 ml de cette solution, on ajoute avec de l'eau bidistillée 2 ml de solution tampon pH 5 et on complète à 10 ml.

Cette solution est prête à être polarographiée.

On effectue parallèlement la même analyse sur une prise contenant une adjonction connue de tyrosine. Cette solution servira d'étalonnage (Méthode de l'étalon interne).

Les résultats suivants ont été obtenus:

Prises (mg)		Saut. (μA)	Tyrosine trouvée mg	Erreur %
Tyrosine	Tryptophane			
9,3	80	5,76	9,6	+ 3
13,7	80 (étalon)	8,40		
16,2	50	10,58	16,05	— 1
21,4	50 (étalon)	14,01		
11,4	25	10,0	10,8	— 5,3
18,2	25 (étalon)	16,3		
12,0	20	6,90	12,2	+ 1,7
16,5	20 (étalon)	9,45		
12,3	20	10,6	11,8	— 4
15,2	20 (étalon)	13,2		
3,5	80	4,55	3,56	+ 1,7
6,2	80 (étalon)	8,00		

6. Application de la méthode au microdosage de la tyrosine

La méthode ayant été mise au point en macroanalyse, nous avons étudié application au microdosage de la tyrosine. Les conditions opératoires ayant donné les meilleurs résultats sont les suivantes:

Il est possible d'effectuer la nitration avec 0,5 ml d'acide nitrique seulement, en utilisant comme récipient une simple éprouvette de 12 cm.

Il est difficile de porter et de maintenir à une ébullition régulière cette petite quantité d'acide sans projections et, par conséquent sans pertes. L'éprouvette n'est donc pas chauffée directement, mais placée à l'embouchure d'un Erlenmeyer à col large contenant de l'eau bouillante. La température se maintient ainsi à environ 95°, cette température est suffisante pour qu'au bout de 2 heures, la réaction soit terminée.

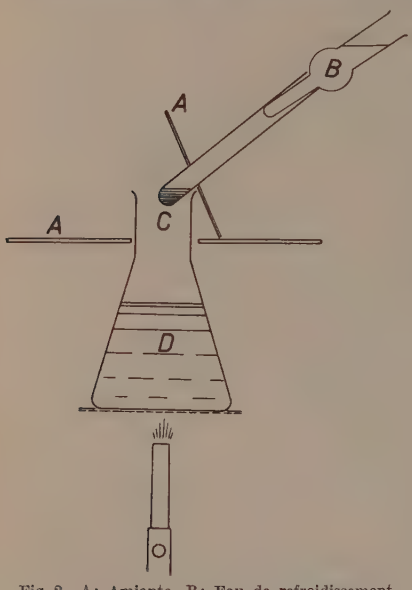


Fig. 2. A: Amiante, B: Eau de refroidissement, C: Produit à nitrer, D: Eau bouillante

Pour que le reflux soit correctement effectué, il est nécessaire que le haut de l'éprouvette soit refroidi. Diverses dispositions concourent à ce résultat, tout d'abord, l'éprouvette assez fortement inclinée traverse un disque de carton d'amiante ne laissant au contact de la vapeur qu'environ deux centimètres de la partie inférieure. L'éprouvette est fermée par un récipient spécial, à doigt contenant de l'eau froide qui arrête les dernières vapeurs. Le col de l'Erlenmeyer est lui-même entouré d'une plaque d'amiante arrêtant la chaleur du bec de gaz (voir fig. 2).

Cette disposition simple est suffisamment efficace pour que le volume de la solution ne diminue pas pendant les deux heures de la nitration.

La nitration étant terminée, on refroidit et on neutralise par KOH à 20% en utilisant un compte-gouttes extrêmement effilé. On introduit la potasse goutte à goutte jusqu'à ce que la solution qui, du fait de son faible volume est pratiquement incolore, prenne une couleur jaune très nette par l'adjonction d'une dernière goutte. On transvase ensuite dans une petite éprouvette de 8 cm (0,7 cm de diamètre) jaugée à 1 ml. On rince soigneusement la grande éprouvette plusieurs fois avec quelques gouttes d'eau et on ajuste finalement au trait de jauge.

On ajoute ensuite 0,4 ml de solution tampon pH 5, ce qui porte le volume final à 1,4 ml. Il est nécessaire d'ajouter cette quantité de solution tampon car la neutralisation ne peut pas être aussi précise qu'avec la macro-méthode.

On utilise pour la polarographie une micro-cuve permettant de travailler sur 1 ml de solution.

En utilisant cette technique, nous avons effectué des dosages de prises comprises entre 10 et 70 μg donnant des concentrations de 7 à 50 μg par ml.

Note

Il est extrêmement important que les éprouvettes soient parfaitement dégraissées par le mélange sulfo-chromique. Les solutions doivent mouiller le verre d'une manière parfaite pour éviter les fâcheuses adhérences de gouttelettes qui rendent les lavages difficiles et aléatoires.

7. Etablissement d'une courbe d'étalonnage, contrôle de la réproductibilité

Les prises sont faites au moyen d'une micro-pipette de 0,1 ml à partir de solutions connues de tyrosine.

On introduit en premier lieu 0,5 ml d'acide nitrique 0,15-n dans l'éprouvette de titration; on introduit ensuite la prise au moyen de la micro-pipette. On rince plusieurs fois par aspirations et refoulements successifs.

On vérifie pendant la nitration que le reflux soit assuré normalement et que le volume contenu dans les éprouvettes ne soit pas diminué. En utilisant un Erlenmeyer à col large, il est possible de traiter simultanément 4 éprouvettes disposées en étoile.

Un certain nombre de mesures effectuées sur le polarographe Sargent, modèle XXI, permet d'enregistrer les résultats suivants: sensibilité 0,030 = μA/mm, h_{Hg} = 31 cm. Damping 1.

Prise (μg)	Conc. μg/ml)	Valeur trouvée	Saut (μA)	K (C/μA)
		Première série		
11	7,85	11	0,375	20,9
33	23,6	34	1,095	21,5
77	55,0	74,4	2,73	20,2
				moyenne 20,9
		Deuxième série		
22	15,7	22	0,66	23,8
44	31,4	42	1,38	22,76
55	39,3	56	1,62	24,2
77	55,0	78,5	2,265	24,3
				moyenne 23,8
		Troisième série		
44	31,4	46	1,26	24,9
55	39,3	52,2	1,74	22,6
77	55,0	78,5	2,265	24,3
88	62,8	86,2	2,70	23,3
				moyenne 23,8

La première série a été faite dans les mêmes conditions opératoires que les deux suivantes, mais la température du local variant de 2 à 3 degrés suivant l'intensité du chauffage, il est très probable que la différence que l'on enregistrée pour la valeur moyenne de K est due pour une bonne partie à une différence de température.

Valeurs des erreurs observées sur ces mesures:

Série I	Série II	Série III
Prise: 11 μg: 0%	Prise: 22 μg: 0%	Prise: 44 μg: + 4,5%
Prise: 33 μg: + 2,9 %	Prise: 44 μg: — 4,5%	Prise: 55 μg: — 5,0%
Prise: 77 μg: — 3,35%	Prise: 55 μg: + 1,8%	Prise: 77 μg: + 2,0%
	Prise: 77 μg: + 2,0%	Prise: 88 μg: + 2,0%

Ces résultats montrent que les erreurs se situent dans un intervalle de $\pm$ 5% au maximum.

Il est possible d'augmenter la précision des dosages en travaillant à une température bien déterminée, la courbe d'étalonnage n'étant valable qu'à cette température. Il peut être plus simple, pour un dosage occasionnel de traiter simultanément des solutions de concentrations connues et voisines, ou encore de procéder par étalonnage interne, comme il a été dit plus haut pour les macrodosages.

Une fois les courbes d'étalonnage établies, des analyses ont été effectuées à titre de contrôle sur des prises inconnues de l'opérateur, de manière a ce qu'il ne soit pas influencé lors du tracé des hauteurs des sauts polarographiques.

Les résultats suivants ont été enregistrés: (l'intervalle donné pour les prises était de 10 à 100 μg, deux solutions de 44 et 66 μg ont été traitées simultanément, on comparera chaque prise inconnue à la prise connue s'en rapprochant le plus).

Prise tyr. (μg)	Conc. tyr. (μg/ml)	Saut (μA)	K (μg/ml)/μA	Conc. tyrosine		Erreur %
				trouvée	réelle	
44	31,4	1,23	25,5	—	—	—
66	47,2	1,89	25,0	—	—	—
X	—	0,375	25,5	13,4	14,3	— 6,3
Y	—	2,115	25,0	74	72,6	+ 1,9

8. Conclusion

Le microdosage polarographique de la tyrosine présente, comme on a pu s'en rendre compte, l'avantage de ne nécessiter qu'un matériel extrêmement simple et réduit; il est d'autre part relativement rapide, l'analyse complète peut être faite en trois heures. La précision de la

méthode est très satisfaisante et il est possible de déterminer dans de bonnes conditions des prises de tyrosine de l'ordre de 10 μg.

Les recherches se poursuivent pour déterminer la tyrosine en présence de tryptophane et de substances contenant le radical —SH dans leur molécule à l'échelle micro. Le principe est le même que dans le cas du macrodosage: la précipitation se fait dans une micro-éprouvette jaugée et, après centrifugation, on prélève pour la nitration une partie aliquote au moyen d'une pipette.

Résumé

Description d'une méthode simple de microdosage de la tyrosine. Cette méthode est basée sur la réduction polarographique d'un dérivé nitré de l'amino-acide. Ce dérivé est obtenu, à chaud, par action d'acide nitrique 0,15-n.

Certaines influences gênantes dues à des substances organiques que l'on rencontre dans les hydrolysats protéiniques ont été éliminées.

La méthode décrite présente l'avantage d'être rapide et de ne nécessiter, outre le polarographie, que du petit matériel de laboratoire tout à fait classique.

Les erreurs que l'on observe sur des prises de 20 à 100 μg sont de $\pm$ 5% au maximum. Elles se situent encore, pour des prises de l'ordre de 10 à 20 μg, dans un intervalle de $\pm$ 7%.

Zusammenfassung

Eine einfache Methode zur Mikrobestimmung des Tyrosins wird beschrieben. Sie beruht auf der polarographischen Reduktion der nitrierten Aminosäure, die man durch Einwirkung von 0,15-n Salpetersäure in der Hitze erhält. Störende Einflüsse gewisser organischer Substanzen in Eiweißhydrolysaten wurden ausgeschaltet. Die Methode bietet den Vorteil rascher Durchführbarkeit und erfordert mit Ausnahme eines Polarographen keinerlei besondere Hilfsmittel. Die beobachteten Fehler betragen für 20 bis 100 μg maximal $\pm$ 5% und liegen noch für 10 bis 20 μg bei $\pm$ 7%.

Summary

A simple method is described for the micro determination of tyrosine. It is based on the polarographic reduction of a nitrated derivative of the amino acid. This derivative is obtained, under heating, by the action of 0.15 *N* nitric acid. Certain interfering influences due to organic substances, which have been encountered in the protein hydrolysates, are eliminated. The method described here has the advantages of being rapid and of not requiring any special auxiliary agents or devices. The errors observed with 20 to 100 μg samples are $\pm$ 5% at most. Moreover, for samples of the order of 10 to 20 μg, they fall in an interval of $\pm$ 7%.

Bibliographie

[1] *D. Monnier* et *Y. Rusconi*, Helv. Chim. Acta **34**, 1297 (1951).

[2] *Y. Rusconi, D. Monnier* et *P. E. Wenger*, Helv. Chim. Acta **34**, 1943 (1951).

[3] *D. Monnier* et *Y. Rusconi*, Analyt. Chim. Acta **7**, 567 (1952).
[4] *H. Meyer* et *E. Riklis*, Nature **172**, 543 (1953).
[5] *W. Troll* et *R. Cannan*, J. Biol. Chem. **200**, 803 (1953).
[6] *F. Bode*, *H. J. Hübener*, *H. Brückner* et *K. Hoeres*, Naturwiss. **39**, 524 (1952).
[7] *J. P. Zalta* et *Y. Khouvine*, Bull. soc. chim. biol. **35**, 697 (1953).
[8] *R. Acher* et *Ch. Crocker*, Biochem. Biophys. Acta **9**, 704 (1952).
[9] *L. K. Ramachandran* et *P. S. Sarma*, J. Sci. Ind. Research **101**, 246 (1951).
[10] *M. Mortreuil* et *Y. Khouvine*, Bull. soc. chim. biol. **36**, 425 (1954).
[11] *G. Gorbach*, Mikrochem. **39**, 204 (1952).
[12] *K. V. Giri*, *K. Krishnamurthy* et *T. A. Venkatasuhamanian*, Current. Sci. **21**, 44 (1952).
[13] *E. Sandegren*, *L. Ljungdahl* et *N. Wittasek*, Mitt. Versuchsanstalt Gärungsgewerbe u. Insts. angew. Mikrobiol. Hochschule Bodenkult. **6**, 72 (1952).
[14] *V. Ya. Brodskii* et *I. M. Limarenko*, Doklady Akad. Nauk S. S. S. R. **95**, 313 (1954).